

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

RICARDO DE OLIVEIRA BOZZO

**AÇÃO DO DICLOFENACO SÓDICO NA REPARAÇÃO DE
INCISÕES CIRÚRGICAS.
ESTUDO HISTOLÓGICO EM PELE DE RATOS**

Tese apresentada ao Curso de pós - graduação em
Odontologia (área de Farmacologia) da Faculdade de
Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de
Campinas, para obtenção do Título de MESTRE em
Ciências

B719a

29438/BC

PIRACICABA - S.P.
1996

Este exemplar foi devidamente corrigido
Conforme resolução COPS-036/83.
Piracicaba, 25 de novembro de 1996
Bozzo

UNICAMP

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

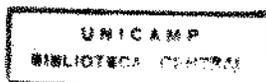
**AÇÃO DO DICLOFENACO SÓDICO NA REPARAÇÃO DE
INCISÕES CIRÚRGICAS . ESTUDO HISTOLÓGICO EM PELE
DE RATOS.**

RICARDO DE OLIVEIRA BOZZO

Tese apresentada ao Curso de pós - graduação
em Odontologia (área de Farmacologia) da
Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Uni-
versidade Estadual de Campinas, para obten-
ção do Título de MESTRE em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Louraço Bozzo

Piracicaba
1996





FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Mestrado, em sessão pública realizada em 28/06/96, considerou o candidato aprovado.

1. Lourenço Bozzo

A handwritten signature in cursive script, written over a horizontal line.

2. Thales Rocha de Mattos Filho

A handwritten signature in cursive script, written over a horizontal line.

3. Sylvio Alves de Aguiar

A handwritten signature in cursive script, written over a horizontal line.

À minha avó

ALMERINDA,

Aos meus pais

ANTONIO CARLOS e CLEUSA

Às minhas irmãs

GISELA e GLÁUCIA

Que mesmo à distância se fizeram presentes em

todos os momentos, meu agradecimento pela

confiança, amor e carinho.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

AO PROF. DR. LOURENÇO BOZZO,

**pela orientação segura e dedicada,
amizade, fé e inspiração na carreira
docente.**

**Aos professores da área de Farmacologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba:
PROF. DR. JOSÉ RANALI, PROF. DR. THALES ROCHA DE MATOS FILHO,
PROF. DR. EDUARDO DIAS ANDRADE, PROF. DR. PEDRO LUIZ ROSALEN,
PROFA. DRA. MARIA CRISTINA VOLPATO, pela dedicação e paciência.**

Aos colegas CLÁUDIO e PEDRO, pela presença amiga e incentivadora.

Ao PROF. DR. SYLVIO ALVES DE AGUIAR, pela oportunidade e confiança.

**Aos PROFESSORES e ALUNOS da FUNDAÇÃO HERMÍNIO OMETTO, que
conviveram comigo, foram meu incentivo e sem os quais não teria sido possível a
realização deste trabalho.**

**Aos técnicos ADEMIR e JOSÉ CARLOS pela ajuda na parte laboratorial e de
manipulação dos animais.**

À todos aqueles que direta ou indiretamente participaram deste trabalho,

OS MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS

SUMÁRIO

1 - Introdução	1
2 - Revisão da literatura	4
3 - Material e Métodos	12
4 - Resultados	15
5 - Discussão dos Resultados	64
6 - Conclusões	74
7 - Summary	75
8 - Referências Bibliográficas	77

1 - INTRODUÇÃO

A inflamação é um processo dinâmico de transformações que ocorrem no tecido conjuntivo, em resposta a uma agressão qualquer, procurando restabelecer a normalidade da área agredida. Entre os fatores capazes de provocar inflamação temos as infecções microbianas, agentes físicos (queimaduras, irradiação, traumatismo), agentes químicos (toxinas, substâncias cáusticas), tecidos necróticos e todos tipos de reações imunológicas. (ROBBINS, 1989).

A inflamação caracteriza - se basicamente pelos eventos vasculares (vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular) e pelos fenômenos celulares (marginação, emigração, migração e acúmulo de leucócitos) no local da agressão. (WILHEIM,1960; ZWEIFACH ,1965;LEPOW,1972.).

Assim a inflamação consiste, na realidade de uma sequência de fenômenos que se inicia no momento da agressão e só termina com a cura ou reparação da área lesada. Toda essa fenomenologia tem uma cronologia determinada pôr substâncias químicas denominadas de "mediadores químicos da inflamação". Estes mediadores que podem ser produzidos no local da lesão, normalmente existem como precursores inativos no plasma, ou são seqüestrados nas células. (TRUMMEL, 1991).

Uma vez liberados na área agredida estes mediadores podem interagir com outros componentes teciduais ou plasmáticos, potencializando ou neutralizando seus mecanismos de ação.

Grande parte dos processos inflamatórios, particularmente os de natureza crônica tem sido tratados com drogas antiinflamatórias não esteróides.

As evidências da ação inflamatória e das propriedades imunorreguladoras da prostaglandina E2 (PGE2) em particular , e a descoberta da ação inibidora dos antiinflamatórios não esteróides na produção das prostaglandinas pelo bloqueio da cicloxigenase (prostaglandina sintetase) permitiram uma plausível explicação das vantagens terapêuticas dessa classe de drogas, numa variedade de processos inflamatórios.

Alguns autores tem contestado os efeitos clínicos de muitas dessas drogas antiinflamatórias , assim como suas propriedades inibidoras seletivas sobre alguns mediadores químicos da inflamação.

Tais mediadores como a histamina, serotonina, bradicinina, prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanas, leucotrienos, fator de agregação plaquetária e sistema complemento, podem atuar de forma isolada ou em conjunto, dependendo do local e dos eventos envolvidos.

Protocolos de investigações clínicas tem mostrado grandes variações nos seus resultados, gerando controvérsias e necessidade de pesquisas que permitam uma avaliação cada vez mais consistente da ação dessas drogas.

No presente trabalho, através da análise histológica a nível de microscopia óptica e do exame clínico pretende - se:

1- Avaliar o efeito de uma droga antiinflamatória não esteróide (Diclofenaco Sódico*) em incisões cirúrgicas experimentais, em pele do dorso de rato, em diferentes períodos de tempo.

2- Comparar a cronologia da resposta inflamatória em ratos (grupo

controle) nas mesmas condições e nos mesmos períodos de tempo.

* Foi usado Diclofenaco Sódico -VOLTAREN - Ciba - Geigy .

2- REVISÃO DA LITERATURA

Estudos clínicos em pacientes com diferentes tipos de reações inflamatórias, tanto crônicas como agudas, tem mostrado uma grande efetividade analgésica, antipirética e antiinflamatória de drogas não esteróides.

A escolha de uma droga apropriada entre um considerável número de compostos, depende, em última análise, da sua eficácia terapêutica, da tolerabilidade e da segurança observadas em condições clínicas.

O diclofenaco sódico é um agente antiinflamatório não esteróide de uma nova estrutura química, que em animais experimentais mostrou um alto grau de atividade antiinflamatória, analgésica e antipirética, em vários modelos farmacológicos. Ele inibiu a biossíntese de prostaglandinas *in vitro* e *in vivo*, e este efeito inibitório explica, pelo menos em parte, o seu mecanismo de ação.

Existem vários fatores a serem considerados quanto a síntese de uma nova droga, tais como sua capacidade de transpor as membranas biológicas, sua estrutura molecular e sua ocupação espacial que regulam a afinidade ao receptor, sua estrutura eletrônica que dá a especificidade de interação droga - receptor; além desses fatores a droga deve possuir uma constante de dissociação (pKa) que favoreça sua absorção, distribuição e excreção. (MENASSÉ et al, 1978)

O diclofenaco sódico foi sintetizado por KRUPP et al (1973), a partir do ácido fenilaminofenilacético, visando desenvolver um antiinflamatório não esteróide com potente atividade biológica.

SALLMANN (1985), descreve as propriedades físico - químicas do sodium { o - [(2,6 - dichlorophenyl) - amino]- phenyl} - acetate, tendo uma constante de dissociação (pka) de 4,0, um coeficiente de partição de 13,4 e uma meia vida plasmática de 1,8 hs. Os elementos estruturais incluem um grupo ácido fenilacético, um grupo amino secundário e um anel fenil contendo dois átomos de cloro, o qual causa torção máxima no anel, facilitando sua ligação ao receptor.

A ação do diclofenaco sódico como inibidor competitivo e irreversível da prostaglandina sintetase foi apresentado por KU et all (1975) , e confirmado por MENASSÉ et all (1978). A atividade antiinflamatória de diferentes drogas, incluindo diclofenaco sódico, é analisada em geral, através do edema inflamatório em pata de rato ou camundongo após administração de carragenina ou kaolin; avaliando - se o efeito antiinflamatório da droga através da comparação do grau de edema dos animais tratados com o grupo controle. A atividade analgésica do diclofenaco foi estudada por Menassé et all (1978) em camundongos albinos machos através do teste de contrações após injeção intraperitoneal de 0,2 ml de solução a de phenyl - p - benzoquinona a 0,025%; 55 minutos depois da administração oral dos componentes do teste. O número de contrações foi contado por um período de 10 minutos a partir do sexagésimo minuto. A potência analgésica das substâncias do teste foi avaliada fundamentada na dose necessária para reduzir o número de contrações em 50%. Em ratos o efeito analgésico foi estudado através da influência dos componentes do teste nas síndromes de contrações induzidas por ácido acético e ácido ecrinic. Foram administrados intraperitonealmente 0,2 ml de solução de ácido acético a 3% ; em ratos, e as contrações foram contadas durante 20 minutos, depois de 01 hora da administração dos componentes do teste.

A potência analgésica foi estimada pela interpolação da dose necessária para reduzir em 50% o número de movimentos de contração. A atividade antipirética foi analisada através de uma indução de reação febril em ratos após a administração de uma suspensão de fungos a 15% (10ml/kg). Dezoito horas após, quando a febre estava estável, foi administrada via oral a droga em grupos de seis animais cada. A temperatura retal foi tomada continuamente da terceira até a quinta hora sendo o efeito antipirético determinado com base nas diferenças de temperatura do grupo tratado e do grupo controle.

Os resultados obtidos pelos autores sustentam a idéia de que o diclofenaco sódico tem uma atividade antiinflamatória, analgésica, antipirética, mas que a inibição da prostaglandina sintetase explica apenas parcialmente seu mecanismo de ação. Acrescentam ainda que, mesmo em baixas concentrações, inibe a transformação do ácido araquidônico em prostaglandinas e que a ação da droga não necessita de estimulação do eixo hipotálamo-pituitário-adrenocortical.

O efeito do diclofenaco sódico sobre vários sistemas enzimáticos in vitro foi estudado por KU et al (1985). Testes em sistemas de células livres mostraram que o diclofenaco sódico é um potente inibidor da ciclooxigenase, tendo efeito apenas discreto nos sistemas de lipoxigenase, e, praticamente, nenhum efeito sobre a fosfolipase A2.

A inibição pelo diclofenaco sódico na produção de leucotrienos pelas células que participam do processo inflamatório é devido a uma reduzida disponibilidade de ácido araquidônico intracelular devido a uma aumentada captação do substrato dentro das vesículas de triglicerídeos. A diminuição da produção de leucotrienos não está ligada diretamente com a inibição da via 5-lipoxigenase ou fosfolipase A2. A

redução na quantidade de ácido araquidônico deveria limitar a produção de prostaglandinas, embora neste caso a manifestação seja prejudicada pelo potente efeito inibitório do diclofenaco sódico na cicloxigenase.

Esta descoberta da ação do diclofenaco, que tem sido caracterizada por estudos em leucócitos isolados, parece para funcionar também "in vivo". Consistente com este mecanismo e não explicável pela clássica inibição da cicloxigenase; o diclofenaco inibiu a produção de leucotrienos no sangue de animais tratados com a droga, e, também suprimiu a infiltração de leucócitos em esponjas implantadas subcutaneamente. O último efeito contrasta com o aumento da infiltração frequentemente obtida com outras drogas antiinflamatórias não esteróides considerado refletir o aumento da produção de leucotrienos.

Em conclusão os autores sugerem através de seus achados que a aceitação ou a preferência pelo diclofenaco sódico não é subjetiva mas está apoiada por bases científicas.

O diclofenaco sódico tem sido indicado clinicamente como potente agente antiinflamatório, analgésico e antipirético, com boa tolerabilidade gastrointestinal.

Seu modo de ação, segundo SCHOLER et alli (1985) envolve uma potente inibição da cicloxigenase e modulação da liberação e captação do ác. araquidônico, resultando em duplo efeito nas vias lipoxigenase e cicloxigenase.

Concluem o trabalho afirmando que o diclofenaco sódico tem potencial de efetivamente atuar nos sintomas clínicos da inflamação e afetar uma ampla variedade de mediadores relacionados com a inflamação e funções celulares.

SCHOLER et alli (1985) mostram que uma dose única por via oral de 2mg/Kg de peso, de diclofenaco sódico, resultou em 40% da inibição de edema

provocado pela carragenina em pata de ratos. No mesmo trabalho os autores estudam a potência analgésica do diclofenaco sódico, através do modelo de contrações em três diferentes condições experimentais em camundongos e ratos, tendo a droga se mostrado efetiva em todos os casos. A atividade analgésica do diclofenaco sódico é mediada pelos receptores periféricos da dor e não por mecanismos centrais.

Alguns estudos feitos por KRAL (1985) em pacientes vítimas de acidente ou de cirurgias proctológicas, provaram a eficiência analgésica do diclofenaco sódico, após a administração do mesmo via intramuscular na dose de 75 mg; foram usadas neste estudo uma escala de intensidade dolorosa e foi observado que a droga diminuiu em 78% a dor 30 min após a injeção e se manteve por mais de oito horas.

RIESS et al (1978) estudando a farmacocinética do diclofenaco sódico através de métodos analíticos usados descreveram quantitativamente a atividade da substância e de seus metabólitos no organismo. Mostraram que a substância ativa do diclofenaco sódico é totalmente absorvida após a administração oral ou retal e é excretada, principalmente na forma metabolizada, parcialmente na urina e parcialmente na bile.

A distribuição da substância ativa e seus metabólitos só puderam ser realizadas em modelos animais através de radiometria após varios períodos de tempo; e com excessão do fígado e dos rins, a maior concentração de diclofenaco sódico marcado foi no sangue.

Através de uma comparação nos valores de excreção e os de administração oral e intravenosa de uma mesma dosagem de diclofenaco sódico os autores concluíram que a droga é totalmente absorvida por via oral em ratos, cachorros, e

macaco rhesus; e que no rato e no cachorro a excreção é predominante biliar, enquanto que no macaco rhesus 80% da dose é excretada via renal. Um estudo similar em humanos, onde foram administradas 50mg de diclofenaco sódico marcados com C14 mostraram que também as administrações via oral são totalmente absorvidas e que a excreção renal é maior que a biliar. No homem o total da droga excretada nas primeiras 96 hs equivale a 90% da droga administrada.

Varios produtos da metabolização do diclofenaco sódico foram encontrados na urina e bile de rato, cachorro, macaco rhesus, babuino e no homem. O metabolismo no cachorro difere radicalmente das outras espécies.

MENASSÉ et all (1978) também descreve a metabolização do diclofenaco sódico e os vários compostos que resultam sua metabolização no homem. O 4-hydroxi (metabólito I) derivado , o principal produto da biotransformação, tem uma ação anti edematosa dose - dependente e é 6 vezes mais potente que o ácido acetil salicílico em relação ao edema; porém 30 vezes menos potente que o próprio diclofenaco sódico. O mesmo metabólito também teve um efeito terapêutico nos modelos de artrite, sendo 40 vezes menos potente que sua fórmula original. Um outro metabólito também se mostrou dose - dependente eficaz na inibição do efeito edematoso provocado por kaolin; já os outros dois metabólitos não apresentaram efeitos significantes sobre o edema.

Em relação ao efeito analgésico os quatro metabólitos apresentaram moderada ação, que pode ser comparada a da fenilbutazona.

Apenas o metabólito I mostrou efeito antipirético, com menor intensidade que o próprio diclofenaco sódico, onde são produzidos 04 metabólitos hidroxilados, sendo que dois destes metabólitos tem efeito anti edematoso e os outros dois não

tem efeito significativo. Os metabólitos não tem um efeito mais potente nem tóxico que o próprio diclofenaco sódico.

WILLIS & KENDAL (1978), após estudos com dois grupos de voluntários , um com média de 22 anos e o outro com média de 62 anos, usando 50mg diários de diclofenaco sódico, via oral, concluíram que, na ausência de fatores interagentes como drogas ou doenças, a capacidade de absorção, metabolização e excreção do diclofenaco sódico parece não sofrer influência da idade do paciente. Estas observações foram confirmadas por ROTH (1985) que usou 07 crianças de 02 a 07 anos de idade que receberam doses únicas de 25 mg de diclofenaco sódico via oral. A porcentagem de eliminação renal foi de 5,4% a 10,2% da dose administrada em 06 dos 07 pacientes. As crianças mais jovens de 02 anos, tiveram uma eliminação renal menor (2,25%) nas doze horas observadas; com essa exceção os demais valores se encontram dentro do contexto de 3% a 11% esperado de eliminação.

Os efeitos colaterais foram estudados por LETHOLA & SIPPONEN (1977), que usaram uma dose de 25 mg de diclofenaco sódico, três vezes ao dia durante oito dias, em seis voluntários saudáveis sendo 04 homens e 02 mulheres, a fim de avaliar através de fotografia feita por gastroscopia e por cortes histológicos retirados do corpo e da porção antral do estômago, os efeitos sobre a mucosa gástrica. Após administração de diclofenaco sódico e análise por gastrofotografia a mucosa gástrica de dois pacientes mostraram lesões superficiais, a mucosa de dois outros se mostraram com erosões lesivas moderadas, enquanto que em outros dois pacientes não ocorreram lesões. Por análise histológica os autores apenas encontraram uma pequena erosão aguda em um paciente.

ROTH (1985) fez um estudo em relação a alterações gástricas, renais e hepáticas, e comparando com outros agentes antiinflamatórios não esteróides usados observou que todos causam modificações na mucosa gastrointestinal, porém as causadas pelo diclofenaco sódico são menos significantes.

As perdas de sangue em pacientes que tomaram uma dose de 75mg por dia de diclofenaco sódico são de 3,66 ml, enquanto que as perdas provocadas por dosagens de 3g ou 4g de ácido acetil salicílico por dia são de 15,82 ml e 19,9 ml respectivamente; em uma análise feita depois do quarto dia de administração.

3 - MATERIAL E MÉTODOS:

3.1 - PROTOCOLO:

Setenta e dois ratos machos, adultos jovens da raça Wistar, pesando em média aproximadamente 250 gramas cada, foram divididos em 12 grupos de 6 ratos, a fim de se avaliar a ação antiinflamatória do diclofenaco sódico. (Voltaren - Ciba - Geigy)

Os ratos receberam doses diferentes de diclofenaco sódico e a resposta inflamatória a uma incisão cirúrgica na pele do dorso desses ratos foi avaliada em 12 períodos de tempo diferentes: 0 , 01, 03, 06, 12, 24, 36, 48, 72, 96, 120, 168 horas.

3.2 - TERAPIA MEDICAMENTOSA :

No homem, a dose inicial, diária da solução injetável de diclofenaco sódico, recomendada pelo laboratório é de 75 mg duas vezes ao dia, ou aproximadamente 2mg/Kg de peso.

Na presente pesquisa, cada grupo de 6 ratos foi assim dividido:

2 ratos - (controle) receberam via intraperitoneal 2mg/Kg de peso de PBS, 01 hora antes da intervenção.

2 ratos - receberam via intraperitoneal 2mg/Kg de peso de diclofenaco sódico , 01 hora antes da intervenção.

2 ratos - receberam via intraperitoneal 4 mg/Kg de peso de diclofenaco sódico, 01 hora antes da intervenção.

3.3 - PROCEDIMENTO CIRÚRGICO:

a) Tricotomia da área a ser operada - realizada 2 dias antes da intervenção cirúrgica.

b) Terapia medicamentosa

c) Antissepsia da região, com álcool 70 , pouco antes da incisão.

d) Incisão cirúrgica de 1 cm de extensão na pele do dorso do rato, com bisturi lâmina 15, tomando o cuidado de não atingir a camada muscular subcutânea.

e) Cada grupo de ratos foi sacrificado num determinado período de tempo: 0,1,3,6,12,24,36,48,72,96,120,168 horas após a incisão cirúrgica.

3.4 - PROCESSAMENTO LABORATORIAL:

Decorrido o período experimental estabelecido , a área operada foi fotografada e os ratos sacrificados.

A pele da região operada foi removida em bloco (2x2 cm) e fixada em formol salino por 24 horas. A seguir, as peças removidas foram recortadas adequadamente, desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol, incluídas em parafina, seccionadas com 5 micra de espessura e coradas pela H.E.

A análise histológica foi feita no fotomicroscópio ZEISS II, assim como as fotomicrografias.

4 - RESULTADOS:

A nível de microscopia óptica, as secções histológicas do grupo controle mostram, na sequência do processo de reparação tecidual, alguns detalhes que diferem um pouco dos grupos experimentais que receberam 2 ou 4 mg/Kg de peso, do diclofenaco sódico .

Para facilitar a descrição, os 03 grupos de ratos serão designados da seguinte forma:

GC: Grupo Controle - recebeu soro fisiológico

G2: Grupo que recebeu 2mg/Kg de peso de diclofenaco sódico

G4: Grupo que recebeu 4mg/Kg de peso de diclofenaco sódico

Os períodos serão designados simplesmente , zero hora, 1 , 3 , 6 , 12 , 24 , 36 , 48 , 72 , 96 , 120 , 168 horas. A descrição poderia ser feita para todos os períodos de cada grupo, ou então, de cada tempo, para os 03 grupos. Nesta pesquisa , optou - se por descrever, a cada tempo, os detalhes dos 03 grupos, que parece mostrar, mais consistentemente, as possíveis variações induzidas pela droga antiinflamatória.

ZERO HORA:

Os aspectos microscópicos observados a este tempo, ou seja, no momento da incisão, mostra apenas os detalhes de uma pele normal de rato. Além do coágulo sanguíneo, que se desprende da maioria das secções, durante o preparo laboratorial, pode - se observar:

- A. Epitélio escamoso estratificado queratinizado, pouco espesso.
- B. Eventualmente, alguns pêlos e folículos pilosos.
- C. Glândulas sebáceas, associadas ou não aos folículos pilosos.
- D. Tecido conjuntivo fibroso denso (T.C.F.D.), com feixes de fibras colágenas dispostas em diferentes direções.
- E. Uma delicada camada de fibras musculares estriadas, separada do tecido conjuntivo fibroso denso por uma discreta camada de tecido conjuntivo frouxo.
- F. Uma camada de tecido conjuntivo frouxo, bastante celularizada e vascularizada, separando, delicadamente a pele, das estruturas e órgãos sobre os quais a pele se apoia.

Tanto o grupo controle (GC) como os grupos experimentais G2 e G4, apresentavam estes mesmos aspectos.

01 HORA:

Uma hora após a incisão, as secções mostram as margens da incisão irregulares, associadas ou não a um discreto acúmulo de fibrina. Pequenos vasos congestionados e alguns poucos leucócitos eventualmente podem ser notados em algumas secções . No tecido conjuntivo frouxo abaixo da camada muscular estes aspectos são mais evidentes que no tecido conjuntivo fibroso denso que forma a maior parte das margens da incisão. (fig. 01)

Os aspectos microscópicos, a este tempo, foram similares, para os 03 grupos.

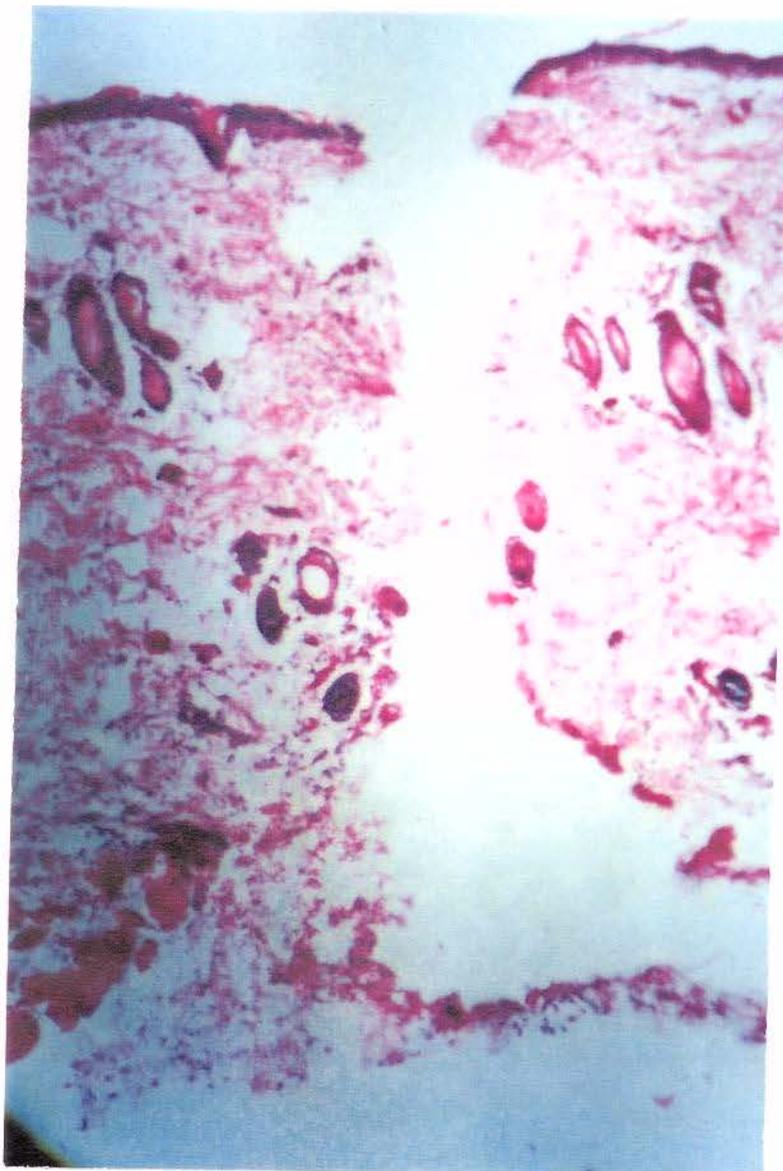


Fig. 01 - Visão geral 01 hora após a incisão da pele de rato. Restos de coágulo sanguíneo, edema, congestão vascular na base da ferida. Aumento original : 25 X

03 HORAS:

Três horas após a incisão, os detalhes observados não permitiram evidenciar diferenças marcantes entre os grupos experimentais e o controle.

Basicamente as secções mostravam as margens da incisão recobertas por um pequeno acúmulo de leucócitos, predominantemente neutrófilos, com os vasos congestionados nas proximidades da incisão. Alguns acúmulos de hemáceas entremeados por leucócitos eram também observados na área da incisão.

A camada muscular seccionada estava sempre entremeada por leucócitos e por edema, principalmente próximo a incisão.

No tecido conjuntivo frouxo, abaixo da camada muscular eram bem evidentes os fenômenos exudativo - vasculares, caracterizados por congestão vascular, marginação leucocitária e diapedese de neutrófilos.

Entretanto, embora os detalhes observados fossem semelhantes para os grupos experimentais G2 e G4, no grupo controle parecia haver uma resposta inflamatória um pouco mais intensa, caracterizada por maior dissociação tecidual e edema, assim como um acúmulo maior de leucócitos, predominantemente neutrófilos.

Esta reação inflamatória do GC, um pouco mais intensa que nos grupos G2 e G4, podia ser observada em toda extensão da incisão, afetando o tecido conjuntivo fibroso denso, a camada muscular e o tecido conjuntivo frouxo abaixo da musculatura.

É importante que se confirme se esta diferença , 03 horas após a incisão , é circunstancial ou se resulta, realmente, da ação antiinflamatória do diclofenaco sódico.

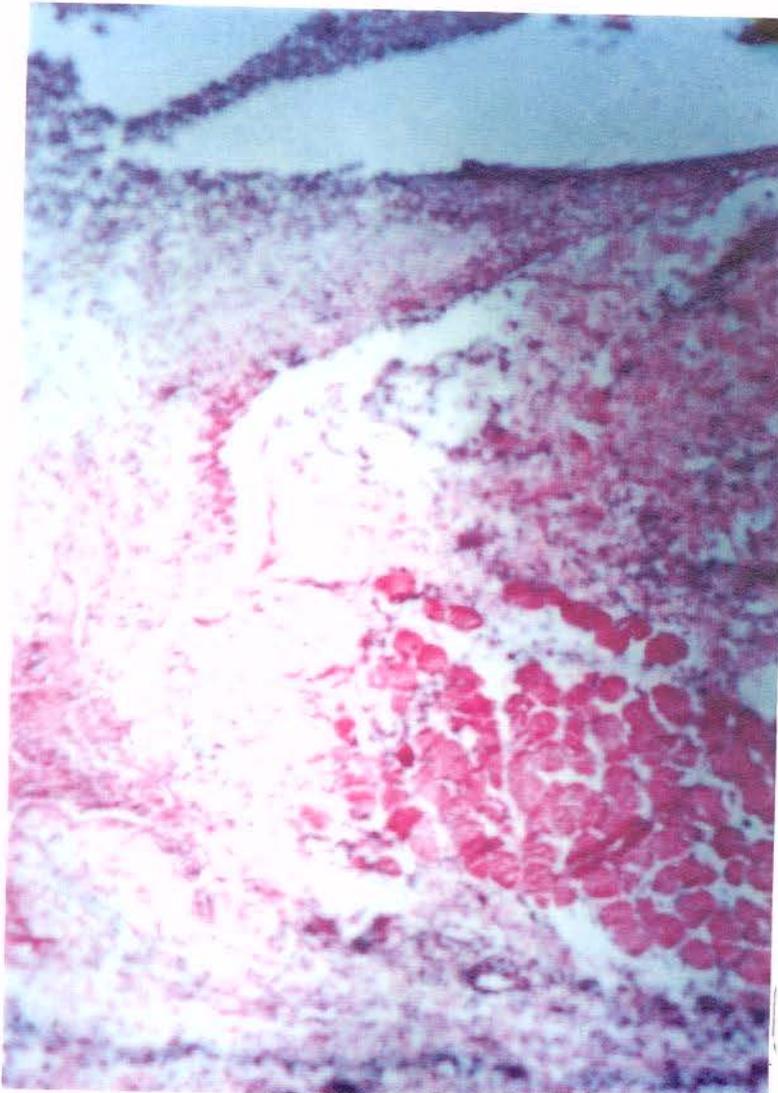


Fig. 02 - Incisão preenchida por coágulo de fibrina, hemáceas, alguns leucócitos próximos á superfície . Nas margens da incisão, observa-se T.C.F.D. , fibras musculares, T.C. frouxo subjacente. Moderado grau de edema e discreta infiltração leucocitária são observadas neste grupo G4 que era semelhante ao G2. A.O: 25X

06 HORAS:

No grupo controle 06 horas após a incisão, pode -se observar um intenso infiltrado de leucócitos, predominantemente de neutrófilos, preenchendo boa parte do espaço incisional. As paredes laterais mostram uma discreta difusão de leucócitos no T.C.F.D. , e um pouco mais intensa no tecido conjuntivo frouxo acima e abaixo das fibras musculares. (Fig. 03)

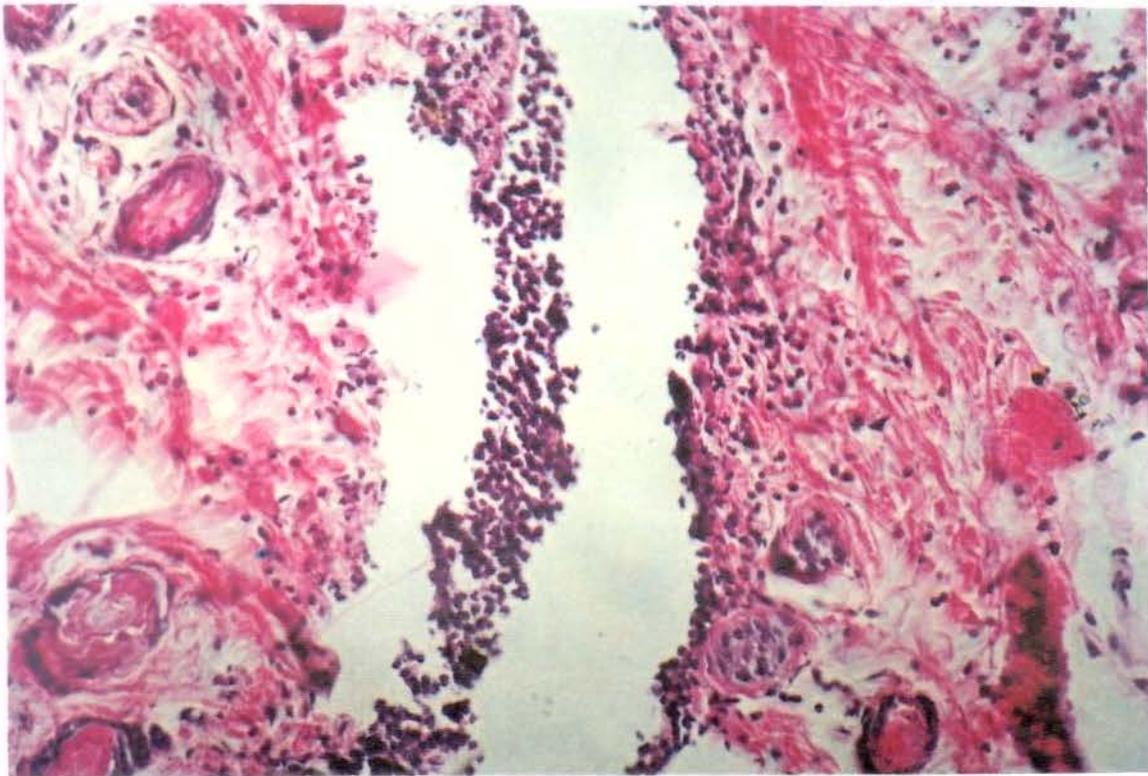


Fig. 03 - GC 6horas - mostrando neutrófilos na área de incisão , e discreta difusão desses neutrófilos por entre os feixes de fibras colágenas das margens da ferida.

A.O: 63X

Nos grupos experimentais G2 e G4, os aspectos são semelhantes. O infiltrado é predominantemente de neutrófilos, é bastante intenso, assim como o edema e a difusão dos leucócitos por entre as fibras musculares e feixes de colágeno. (Fig. 04)

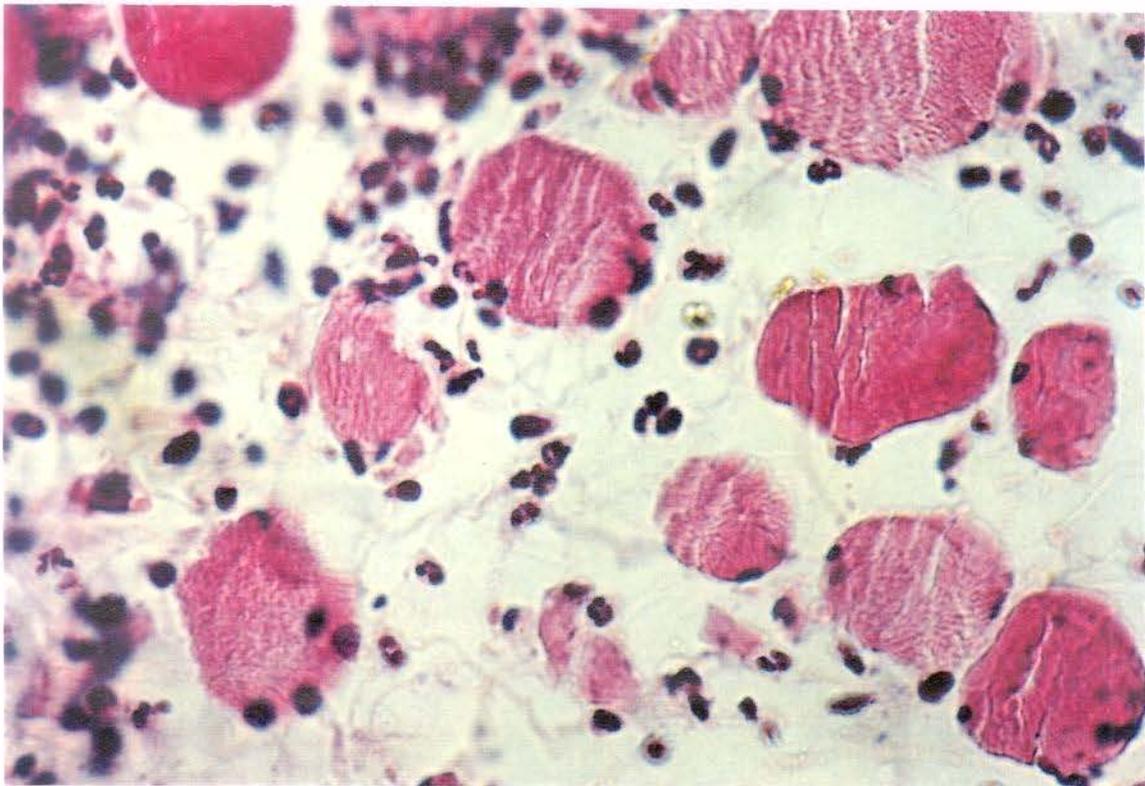


Fig. 04 - G2 06 horas - mostrando a dissociação das fibras musculares pelo edema e pela infiltração de leucócitos não só neste grupo como também no G4. A.O: 160X

A cuidadosa revisão de todas as secções dos 03 grupos , a este tempo , não permitiu diferenciar, de maneira clara, os detalhes presentes a este tempo.

12 HORAS:

Doze horas após a incisão, pode - se observar, de maneira consistente, tanto no grupo controle GC como nos experimentais G2 e G4, respostas semelhantes.

Em todas as secções, os detalhes mais significativos mostram uma intensa infiltração de neutrófilos e macrófagos, edema e fagocitose do coágulo sanguíneo. (fig. 05).

As paredes laterais da incisão mostram, na altura do T.C.F.D. , uma discreta infiltração celular junto às margens da incisão, com alguma congestão vascular, discreto edema e moderada dissociação das fibras musculares.

Também a este tempo as pequenas diferenças observadas nas secções não permitem uma evidência mais consistente da ação do medicamento.

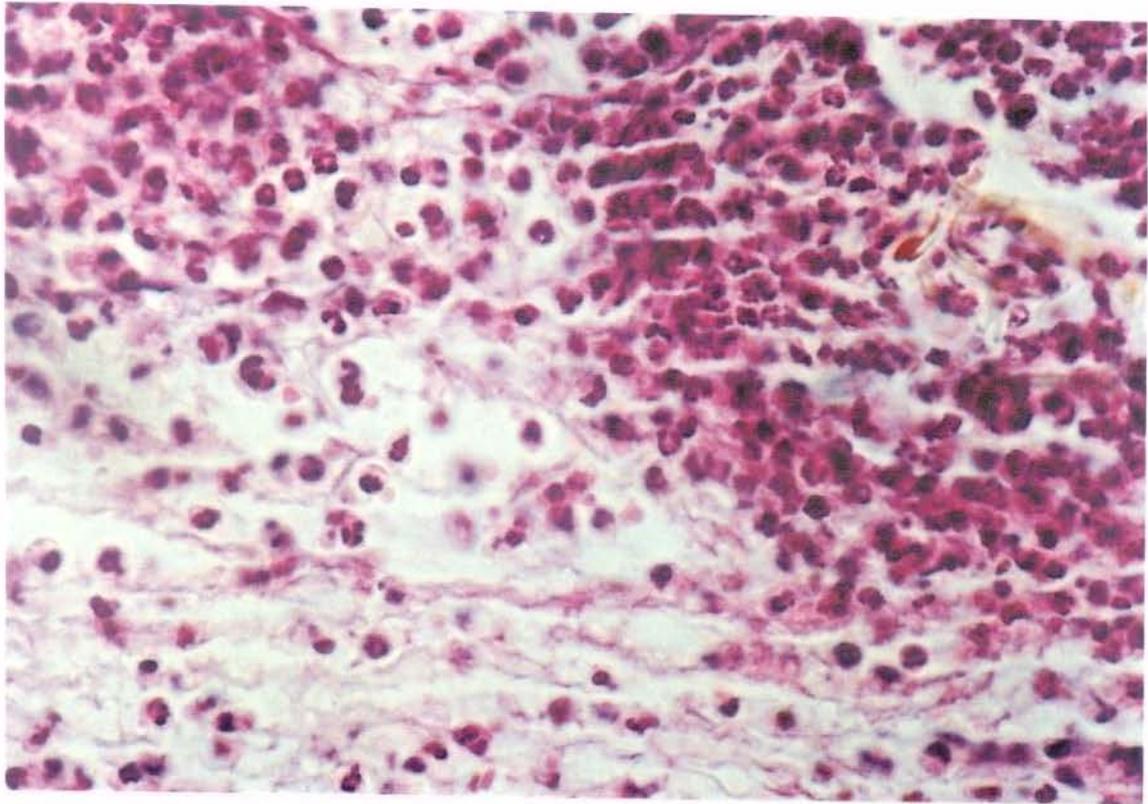


Fig.05 - GC 12 horas - Área da incisão, com substituição do coágulo por infiltrado de neutrófilos e macrófagos. Os mesmos detalhes foram observados nos grupos G2 e G4. A.O: 160X

24 HORAS

Com 24 horas , os controles mostram uma completa substituição do coágulo por um infiltrado leucocitário.

As margens do T.C.F.D. mostram uma discreta dissociação, edema e infiltração leucocitária. Os mesmos detalhes podem ser observados na camada muscular.

No tecido conjuntivo frouxo subjacente, o edema discreto, a infiltração leucocitária e a congestão vascular, embora presentes não são muito intensas, embora se estendam a alguma distância da incisão. Estes detalhes são bem consistentes em ambos controles.

Os grupos experimentais G2, mostram detalhes mais ou menos semelhantes ao GC (Fig. 06). Entretanto , no G4, a resposta inflamatória, é , aparentemente, um pouco mais severa, evidenciada não só pela intensa infiltração de leucócitos, edema e congestão vascular, mas também pela dissociação das fibras musculares. (Fig. 07)



Fig. 6 - G2 24 horas - Infiltração leucocitária e edema, extendendo - se no tecido conjuntivo frouxo acima e abaixo da camada muscular, além da dissociação das fibras musculares. A.O: 25X

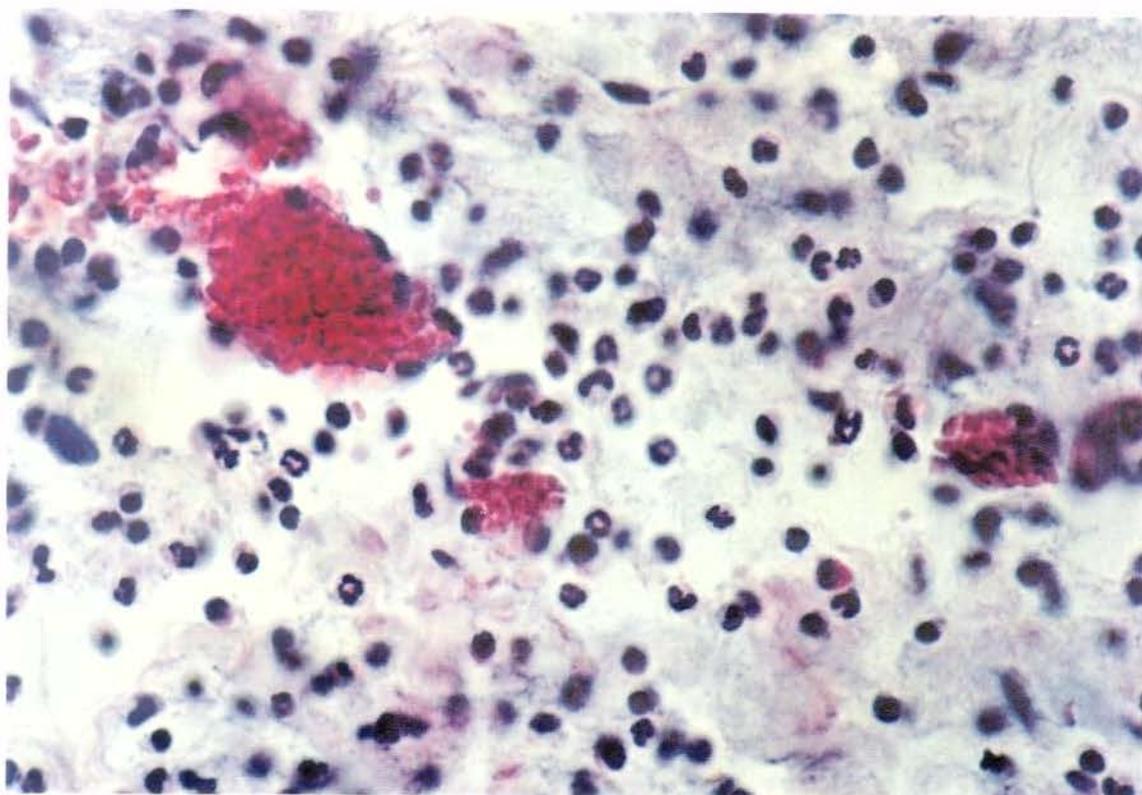


Fig. 07 - G4 24 horas - Intensa infiltração de leucócitos, congestão vascular, observados no tecido conjuntivo frouxo que se insinua da base para a borda da incisão . A.O: 160X

36 HORAS

Após 36 horas pode -se observar na superfície da incisão, tanto nos grupos controles, como nos experimentais, uma marcada infiltração de fagócitos. Parte do coágulo que preenchia a área da incisão é fagocitado e digerido, aparecendo no espaço apenas restos de estruturas teciduais e macrófagos (fig. 08).

As paredes de T.C.F.D. , assim como as fibras musculares mais próximas à incisão mostram - se degeneradas e infiltradas por macrófagos e linfócitos. Observa-se, em todos os grupos (GC, G2 e G4) uma repetição desses detalhes mostrados na figura 09. Entretanto, uma análise mais detalhada de todas as secções mostra que no grupo G4, os fenômenos destrutivos parecem mais intensos, evidenciados pela presença marcante de neutrófilos e macrófagos, e da extensão maior da destruição tecidual.

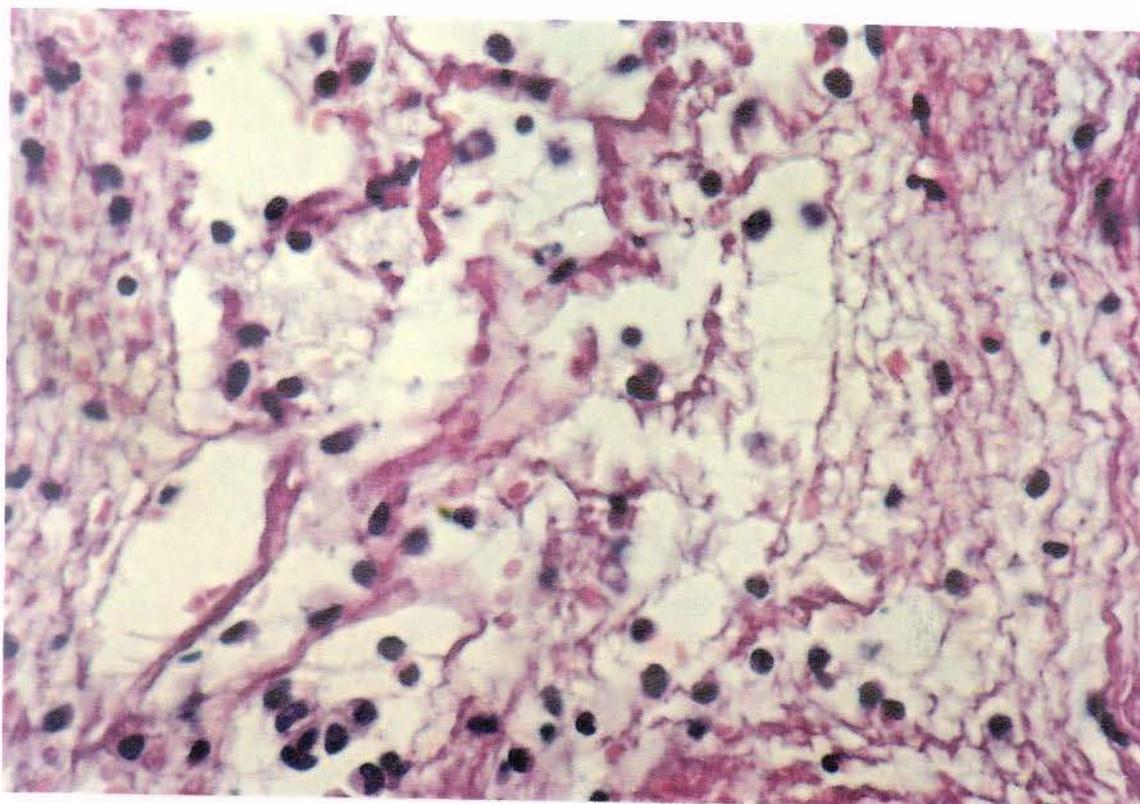


Fig.08 - G2 36 horas - Macrófagos e restos teciduais degenerados preenchendo parte superior da incisão. A.O: 160X

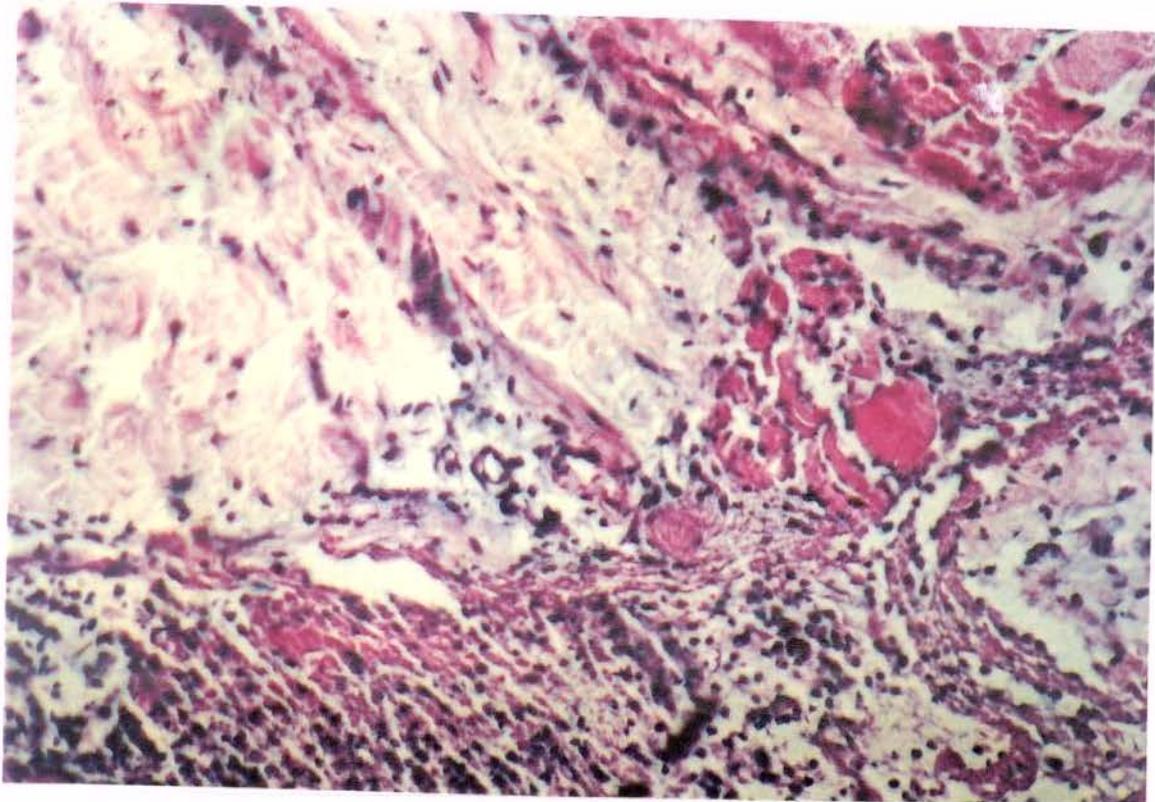


Fig. 09 - G2 36 horas - Restos teciduais degenerados, entremeados por macrófagos preenchendo a área da incisão . Degeneração das fibras musculares de do T.C.F.D. nas margens da incisão. A.O: 63X

48 HORAS:

Com 48 horas, as secções do grupo controle mostram ainda um infiltrado de leucócitos, com predominância de macrófagos e linfócitos, preenchendo toda a extensão da incisão.

As paredes mostram intensa desorganização, não só do T.C.F.D. próximo à incisão, mas também nas fibras musculares.

O edema e a infiltração de fagócitos são bem evidentes por entre as fibras musculares degeneradas . (Fig. 10). Mais afastado da área inflamada sinais do início de fenômenos proliferativos podem ser observados juntos às paredes vasculares e ao tecido conjuntivo viável.

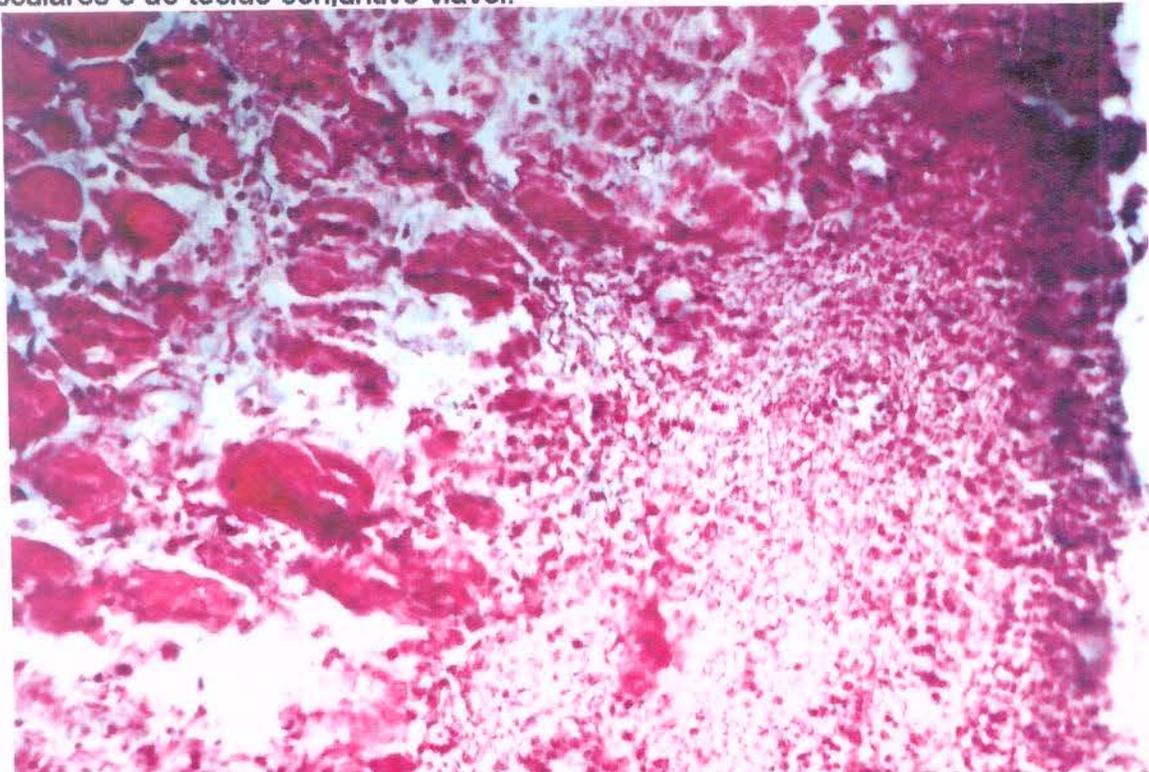


Fig. 10 - GC 48 horas - material necrotico entremeado de leucocitos, na parte mais central da incisão e degeneração das fibras musculares e do T.C.F.D. junto às margens da incisão. A.O: 63X

Nos grupos experimentais G2 e G4, o infiltrado inflamatório, além de mononucleares apresenta um número grande de neutrófilos, um pouco diferente do que se observou no GC.

As figuras 11 e 12, respectivamente G2 e G4, mostram, que além da degeneração das fibras musculares, e do edema a presença de um infiltrado inflamatório.

Parece evidente que nos grupos experimentais existe um certo retardo no processo de reparação, em relação ao grupo controle.

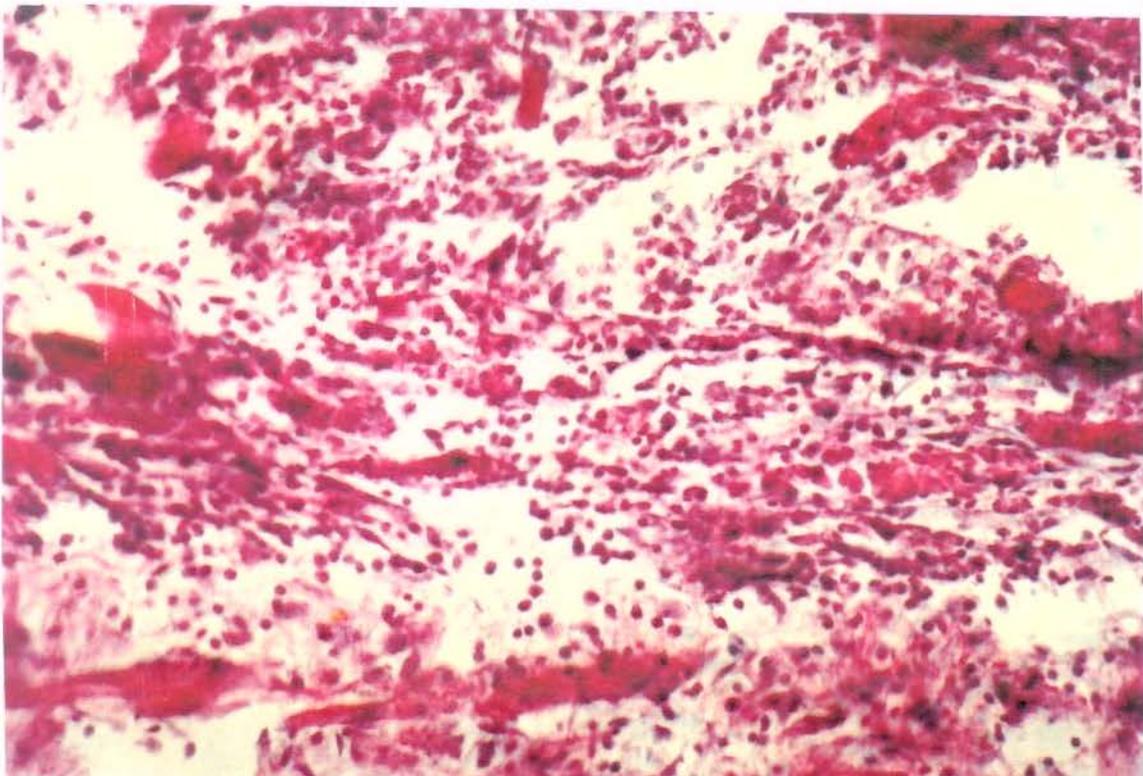


Fig. 11- G2 48 horas - Infiltrado inflamatório predominantemente de neutrófilos, intensa dissociação das fibras musculares. A.O: 63X

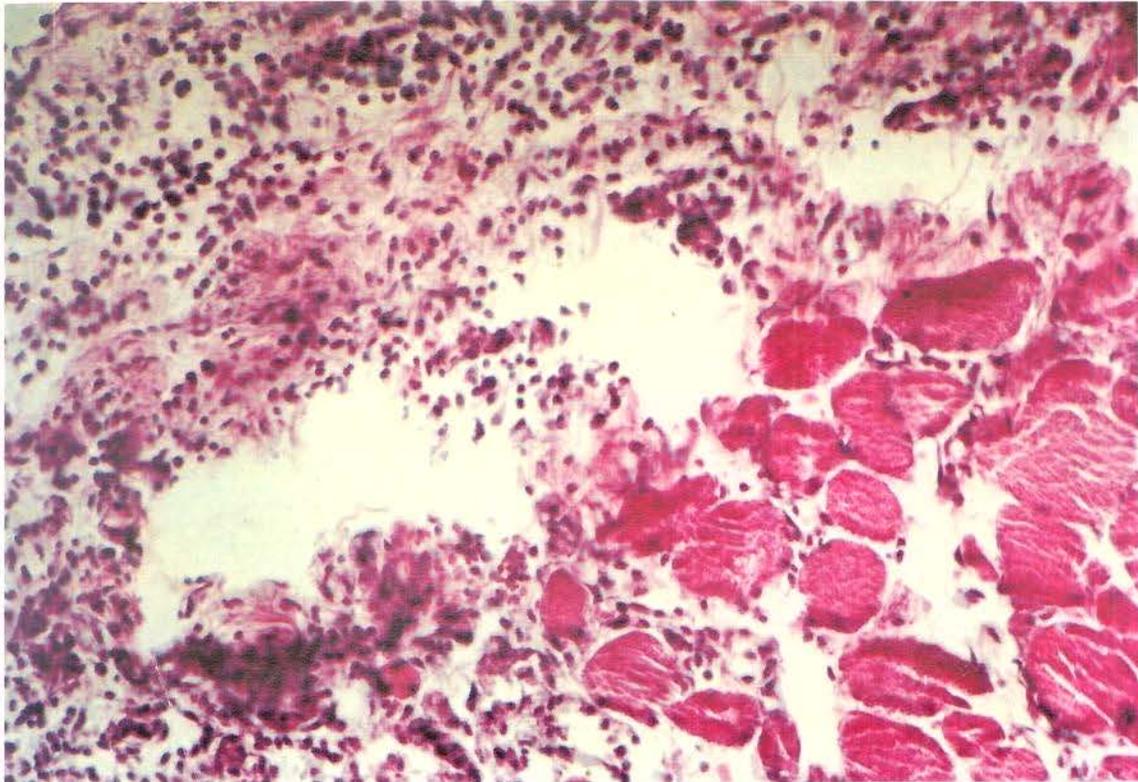


Fig.12 G4 48 horas - Infiltrado de neutrófilos, parte das fibras musculares em degeneração entremeadas de macrófagos. A.O: 63X

72 HORAS:

Com 72 horas os controles já mostram início de reorganização das paredes da ferida, neoformação vascular, evidenciados pelo início da proliferação de alguns poucos fibroblastos e angioblastos em meio a alguns macrófagos, simultaneamente à fagocitose e degradação das fibras musculares. Remanescentes de coágulo ainda são observáveis na fenda da incisão. (Fig. 13 e 14).

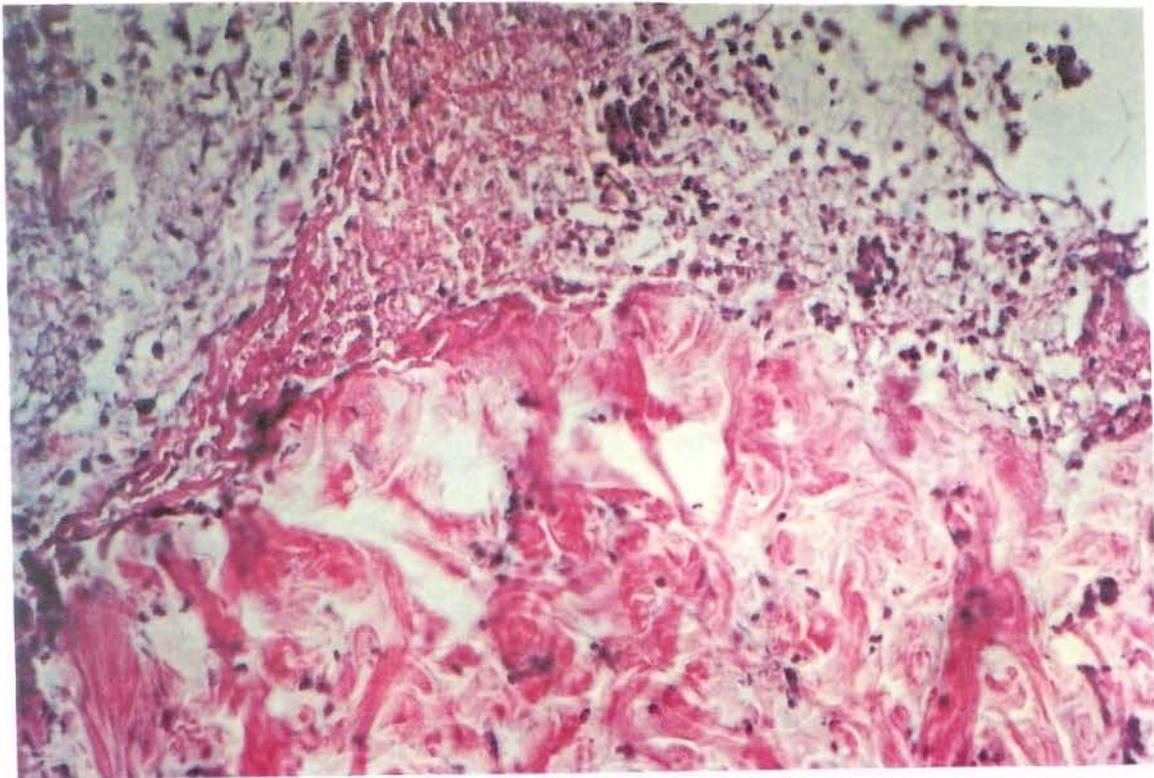


Fig 13 - GC 72 horas - Reorganização das paredes da incisão , proliferação de angioblastos e fibroblastos em meio a infiltrado de macrófagos e linfócitos. A.O: 63X

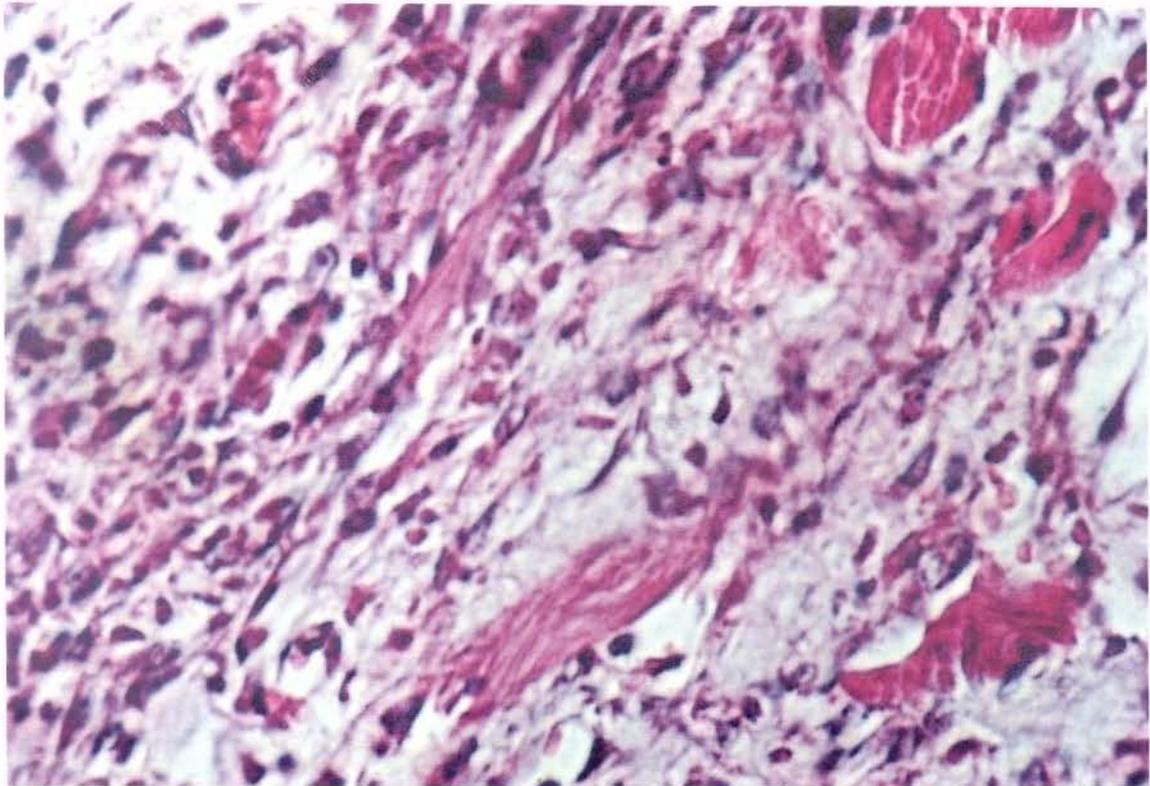


Fig 14 - GC 72 horas - Fagocitose e degradação de fibras musculares, neoformação vascular com proliferação de angioblastos e fibroblastos. A.O: 160X

O grupo experimental G2 mostra uma camada de T.C.F.D. hialinizado envolvido por um intenso infiltrado de neutrófilos e, junto à camada muscular intensa proliferação de angioblastos e fibroblastos. (Figs. 15 e 16)

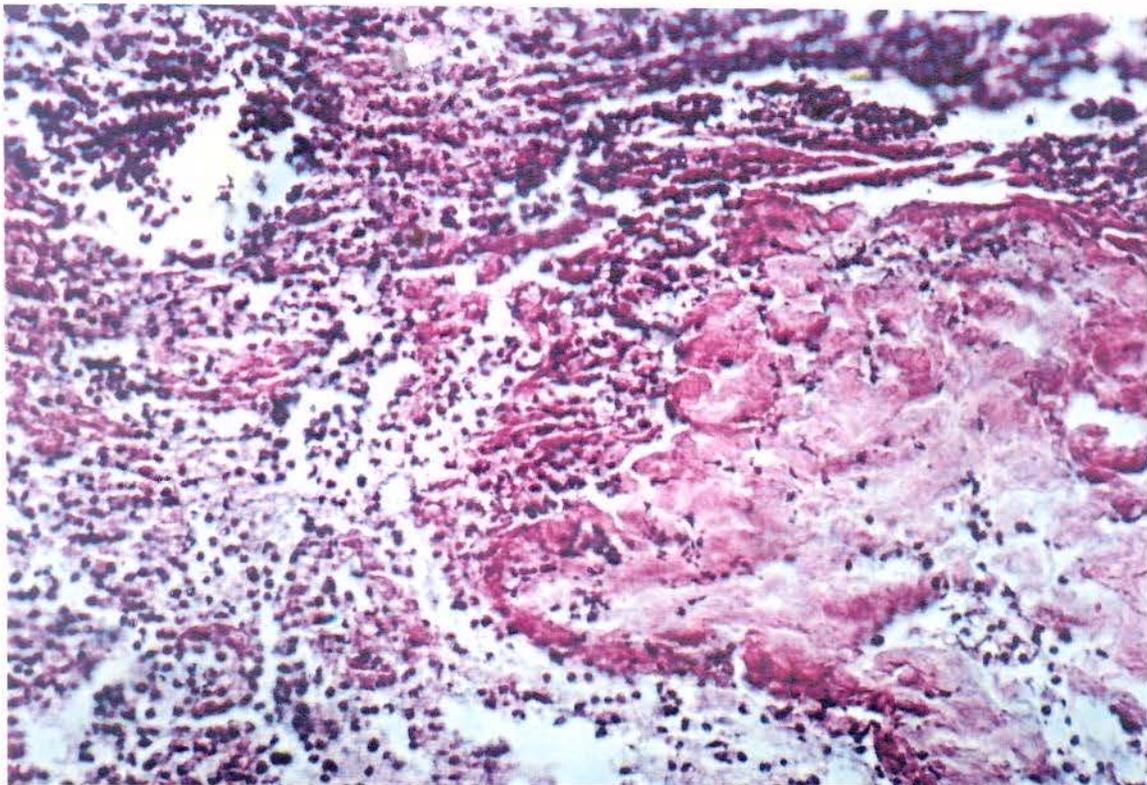


Fig. 15 - G2 72 horas - T.C.F.D. hialinizado, infiltrado de neutrófilos, preenchendo grande parte do espaço incisional. A.O: 63X

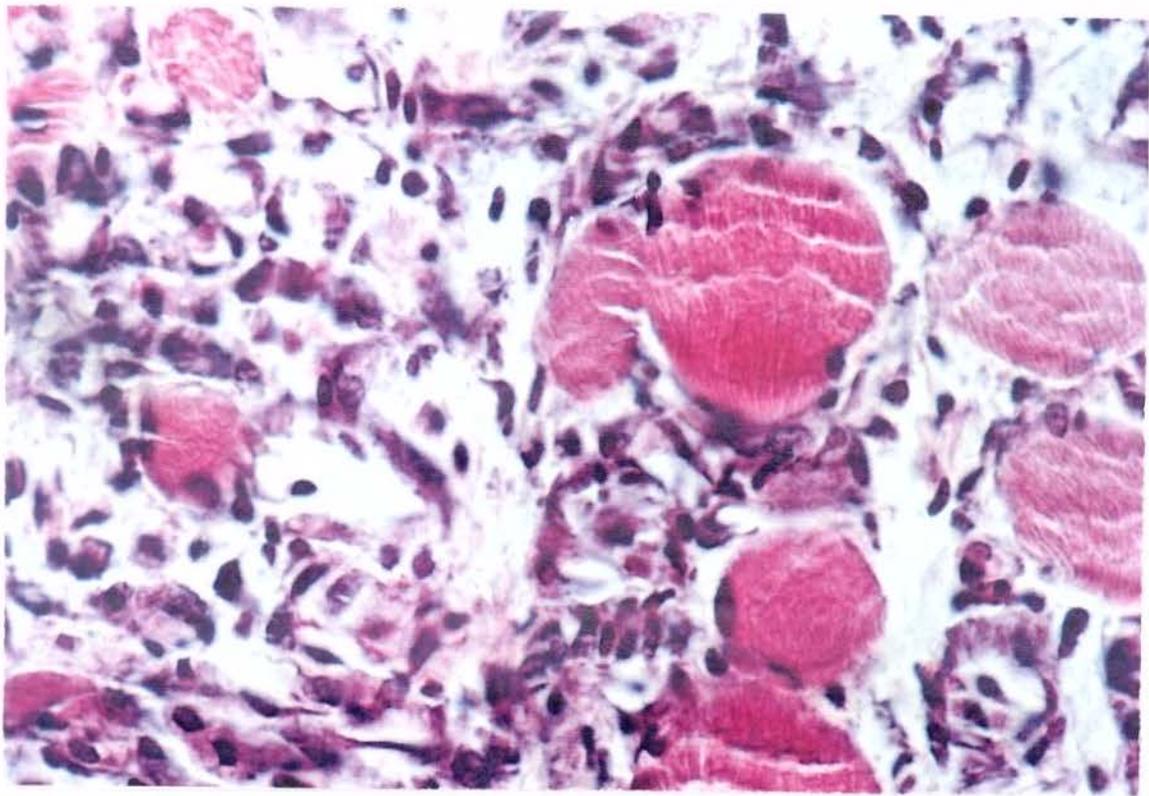


Fig. 16 - G2 72 horas - Camada muscular com intensa proliferação de angioblastos e fibroblastos. A.O: 160X

No grupo experimental G4, os remanescentes de fibras musculares ainda sofrem o processo de fagocitose em meio a uma proliferação de fibroblastos e angioblastos, os remanescentes do coágulo, juntamente com o T.C.F.D. hialinizado é fagocitado nas margens da ferida, enquanto mais para o interior do T.C.F.D. há um início de proliferação de angioblastos e fibroblastos. (Fig. 17)

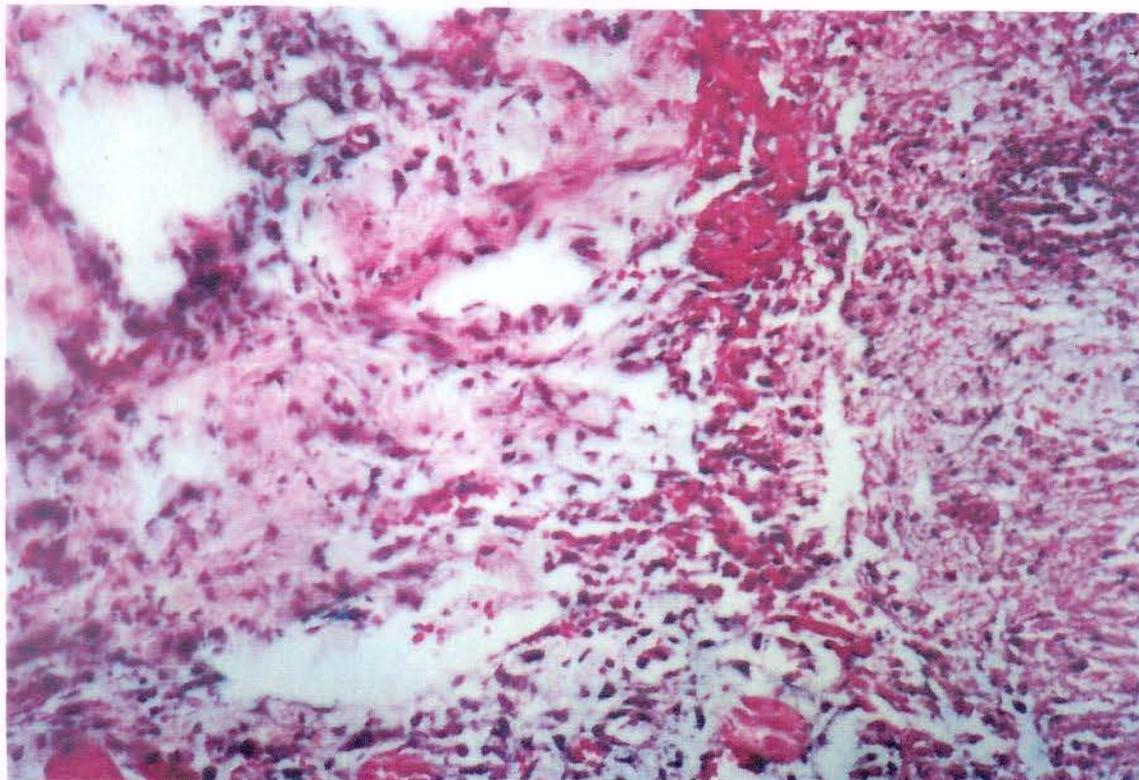


Fig. 17 - G4 72 horas - T.C.F.D. hialinizado sendo fagocitado, proliferação de angioblastos e fibroblastos tanto no tecido conjuntivo como nas fibras musculares.A.O: 63X

96 HORAS:

Às 96 horas, no grupo controle, observa-se numa ampla visão (Fig. 18) que o espaço da incisão está preenchido por um tecido que apresenta as seguintes características:

Na superfície, uma camada de material necrótico; subjacente a esta camada, existe uma faixa contínua de neutrófilos, viáveis e em diferentes estágios de desintegração.

Entre esta camada de neutrófilos e o tecido de granulação já formado na porção mais profunda da ferida, observa-se uma faixa de material granuloso entremeado de macrófagos e alguns fibroblastos. (fig. 19)

Bem próximo às margens da ferida, tanto no T.C.F.D. como na camada muscular a proliferação de angioblastos e fibroblastos já se faz evidente, enquanto que na porção mais central ainda persistem os macrófagos e um material granuloso basófilo, provavelmente restos de fibrina e outros materiais fagocitados e digeridos.

Na região mais profunda da ferida (fig. 20), uma extraordinária proliferação vascular e fibroblástica já parece preencher o espaço das fibras musculares degeneradas. Alguns vestígios da atividade fagocitária de macrófagos ainda podem ser observadas assim como focos hemorrágicos recentes, junto a vasos neoformados.

A este tempo fica bem claro, o processo de reparo a partir do T.C. mais profundo, e a porção mais central do espaço incisional, sendo gradualmente

regenerados, mas com algum atraso, em relação às outras áreas onde o tecido de granulação neoformado vai substituindo as estruturas lesadas.

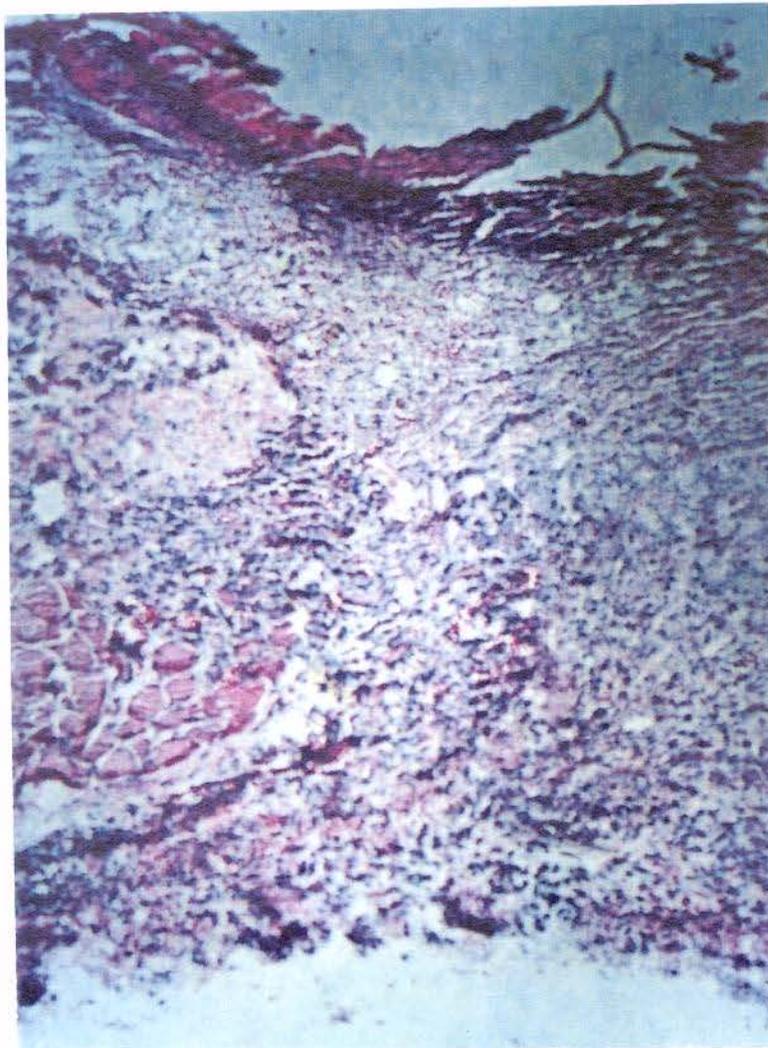


Fig. 18 - GC 96 horas - Ampla visão : camada material necrótico, faixa contínua de neutrófilos em fase de desintegração . Próximo às margens: proliferação de angioblastos e fibroblastos. Porção central : macrófagos e material granuloso basófilo. A.O: 25X

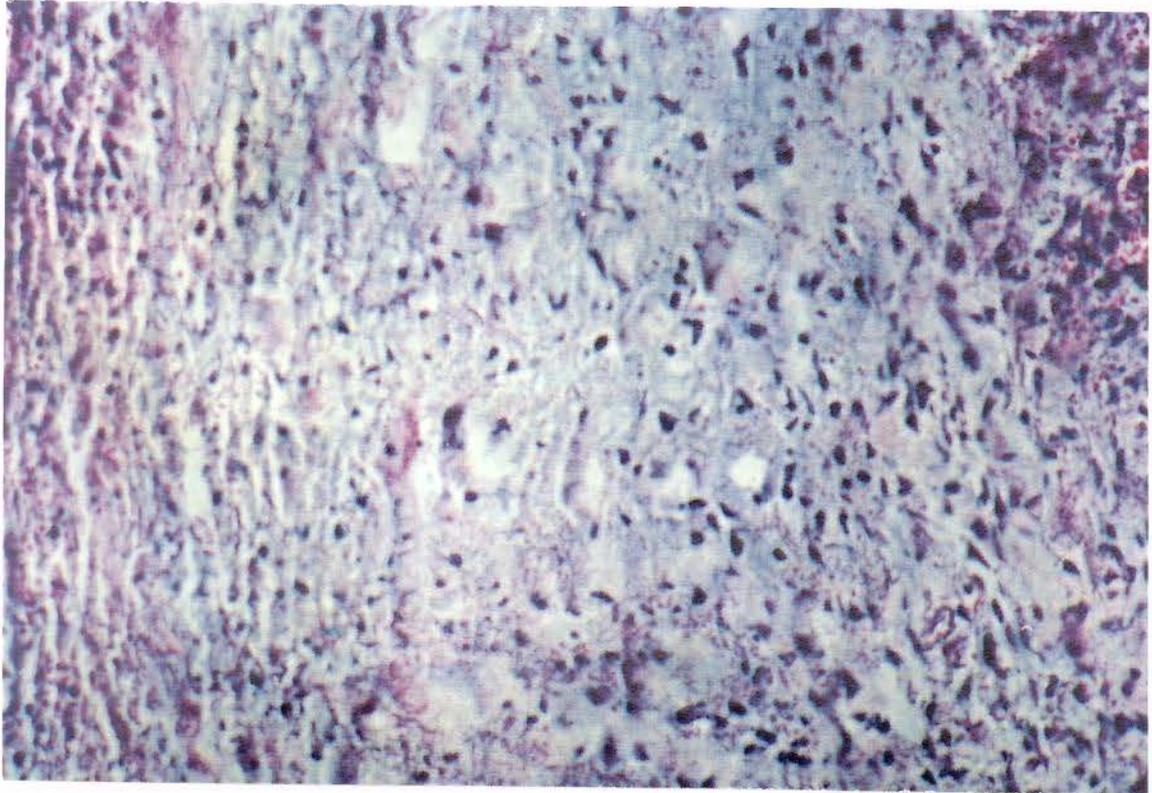


Fig. 19 - GC 96 horas - Faixa de material granuloso entremeado de macrófagos e alguns fibroblastos entre camada de neutrófilos e o tecido de granulação. A.O: 63X

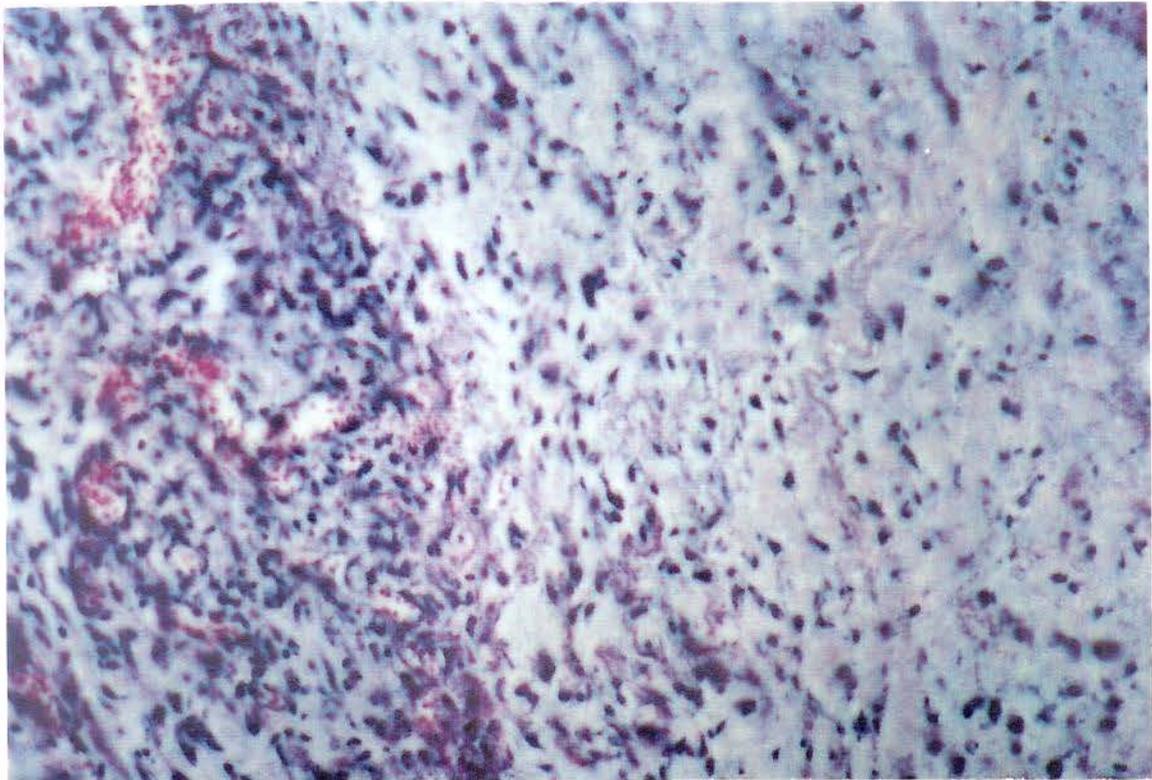


Fig. 20 - GC 96 horas - Porção mais profunda da ferida: proliferação vascular e fibroblástica, atividade fagocitária de macrófagos, vasos neoformados , focos hemorrágicos. A.O: 63X

Apesar de restos teciduais no espaço da incisão do grupo G2, o epitélio migrou e recobriu toda ferida. Abaixo do epitélio observa-se junto às margens, a partir do T.C.F.D. o início da proliferação vascular e fibroblástica, com alguns focos de hemorragia recentes. (Fig 21).

Mais para a porção mediana ainda há presença de restos de fibrina e de células degeneradas em meio a fagócitos e alguns fibroblastos.

Na parte mais profunda, isto é, na base da ferida, apesar de grande número de macrófagos em atividade fagocitária, observa -se também, o início da formação do tecido de granulação, proliferação de angioblastos e fibroblastos e presença de alguns linfócitos. (Fig. 22).

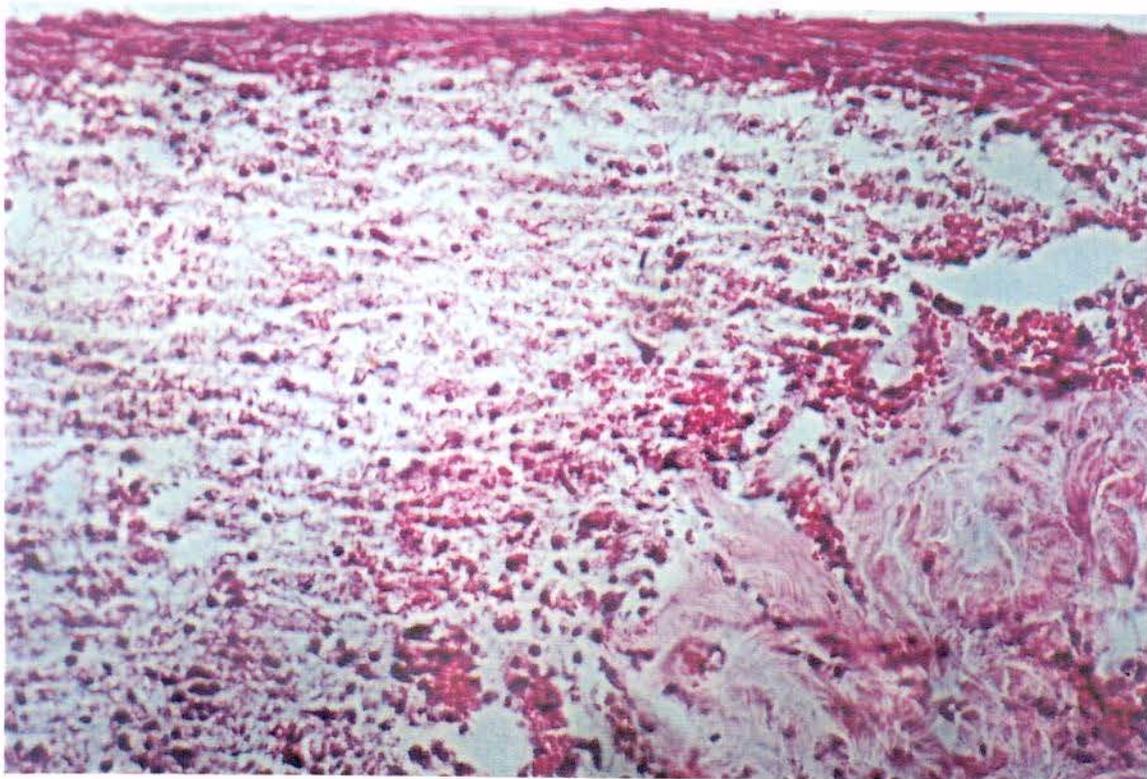


Fig. 21 G2 96 horas - Epitélio recobrimdo a ferida, margens da ferida: proliferação vascular e fibroblástica, focos hemorrágicos. A.O: 63X

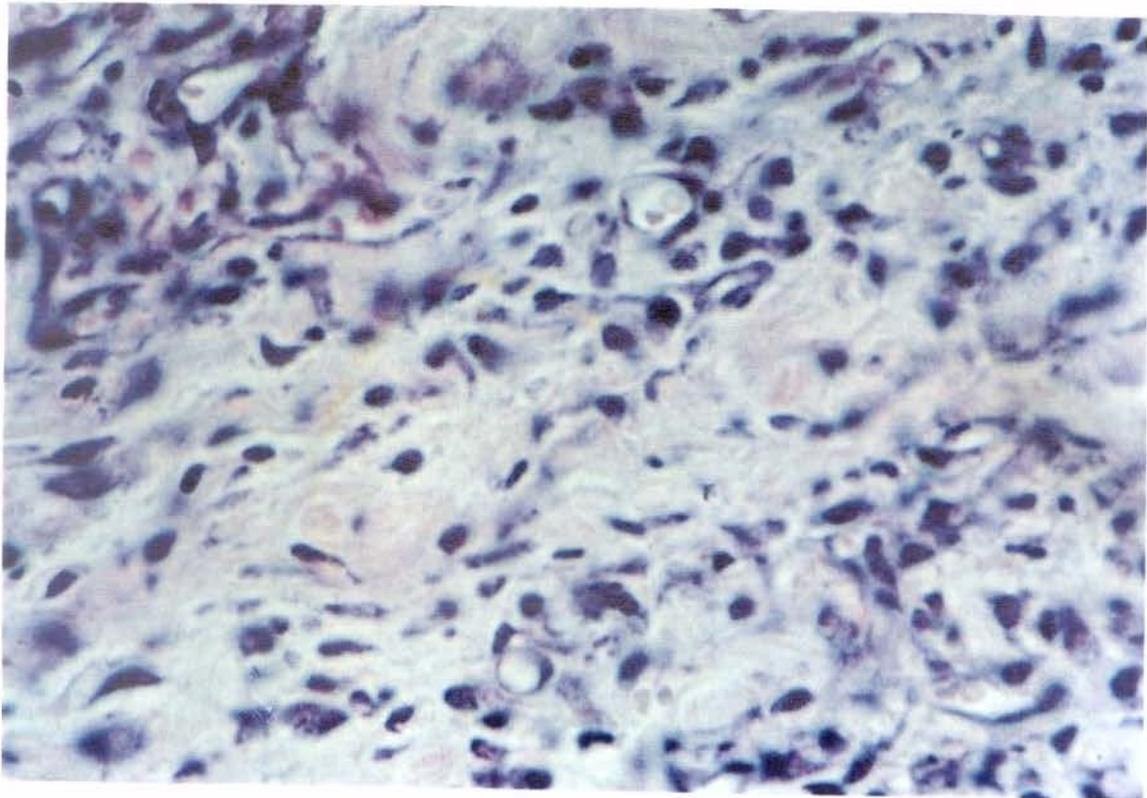


Fig. 22 G2 96 horas - Base da incisão , proliferação de angioblastos, fibroblastos, atividade fagocitária dos macrófagos, presença de alguns linfócitos. A.O: 160X

O grupo G4 mostrou um retardo na reparação em toda extensão da ferida. Restos de fibrina e outras estruturas teciduais, de aspecto granuloso, basófilo, estavam entremeadas de macrófagos e neutrófilos.

A atividade proliferativa de fibroblastos e células endoteliais praticamente não existiam. (Fig . 23).

Mesmo na base da incisão, o tecido conjuntivo frouxo apresentava -se ainda edemaciado , infiltrado de mononucleares (macrófagos e linfócitos). Apenas um pouco mais a distância, junto às fibras musculares é que se podia observar o início da formação do tecido de granulação. (Fig . 24)

Ambos os animais deste grupo, mostram em relação ao grupo controle e ao grupo G2, um evidente retardo no processo de reparação .

Neste período, a similaridade das preparações laboratoriais, permitiram estas observações.

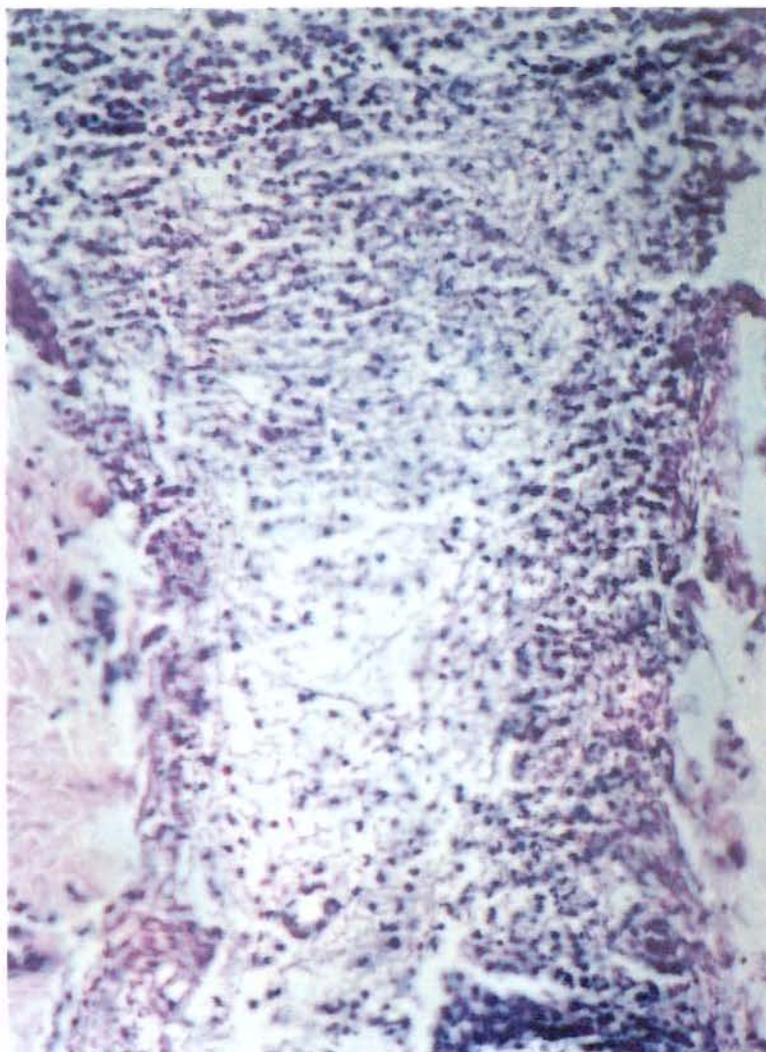


Fig. 23 - G4 96 horas - Retardo da reparação em toda extensão da ferida, restos de fibrina, estruturas teciduais de aspecto granuloso, macrófagos e neutrófilos.A.O: 25X

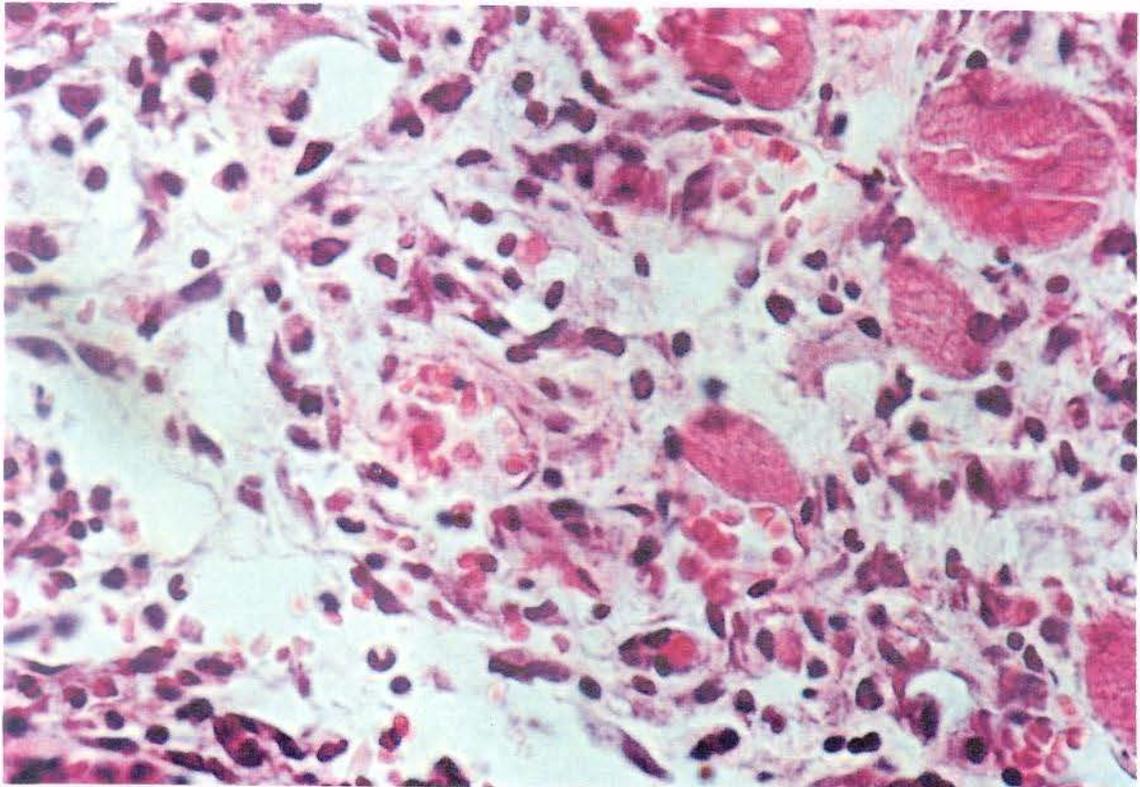


Fig. 24 G4 96 horas - Base da incisão , T.C. frouxo edemaciado com infiltrado de mononucleares , formação de tecido de granulação junto às fibras musculares. A.O:

160X

120 HORAS:

A este tempo (5 dias), todo o espaço cicatricial está preenchido por um tecido de granulação ricamente celularizado. Fibroblastos, angioblastos, macrófagos e linfócitos preenchem toda a faixa da incisão, desde o epitélio, que já recobriu a ferida, até a base da incisão.

A faixa ricamente celularizada que substituiu o coágulo de fibrina, no espaço incisional, aparece bem nos dois animais do grupo controle. (Fig. 25).

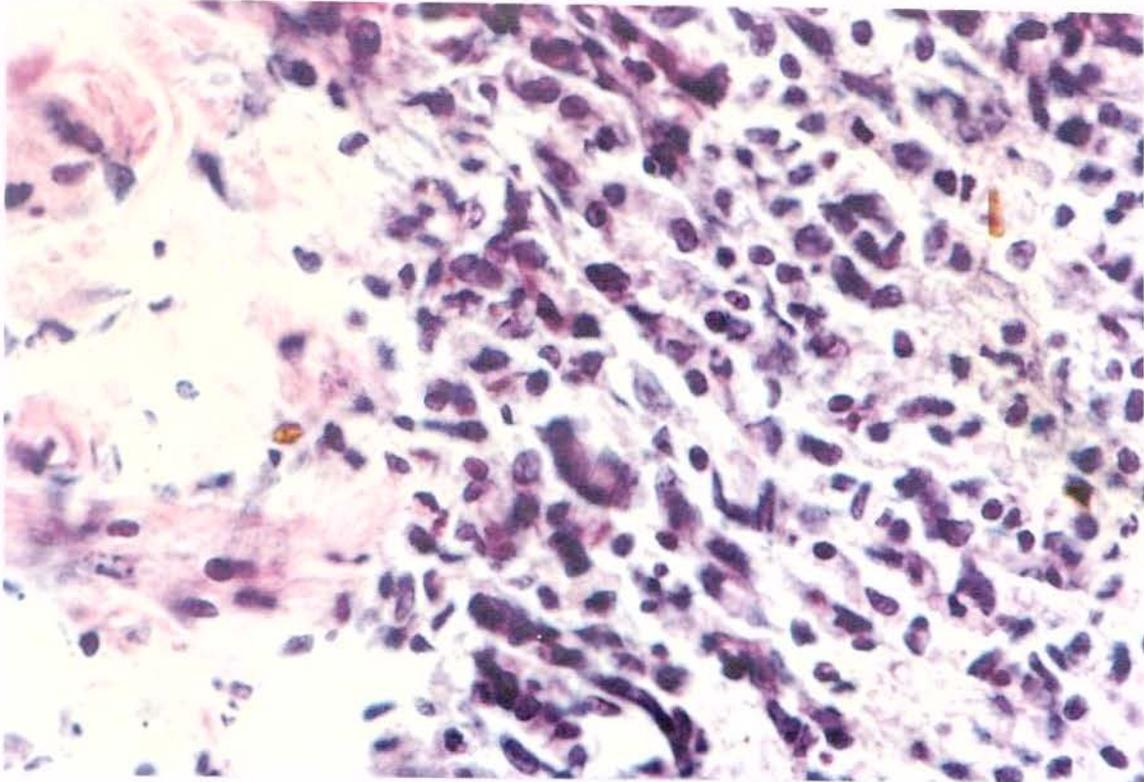


Fig. 25 - GC 120 horas - Espaço incisional preenchido por tecido de granulação, em contacto com remanescentes do TCFD da parede da incisão. A.O: 160X

No grupo G2 observa-se o epitélio recobrindo um tecido de granulação ricamente celularizado. Em toda lesão cicatricial, há presença de fagócitos e linfócitos entremeados de fibroblastos e angioblastos. (Fig. 26). Na porção subjacente ao epitélio escamoso estratificado a proliferação é predominantemente de fibroblastos e angioblastos, sendo o número de mononucleares pequeno. (Fig. 27).

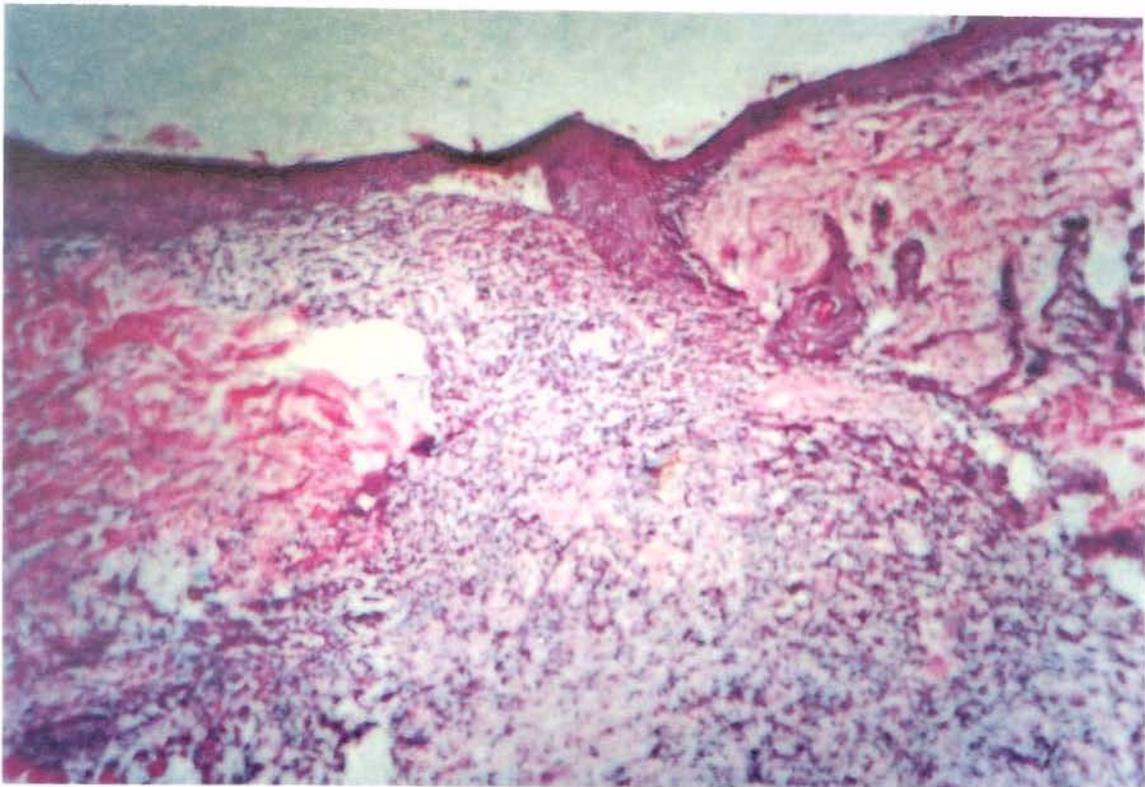


Fig. 26- G2 120 horas - Epitélio recobrindo tecido de granulação celularizado. Lesão cicatricial, com presença de linfócitos e fagócitos entremeados a angioblastos e fibroblastos. A.O: 10X

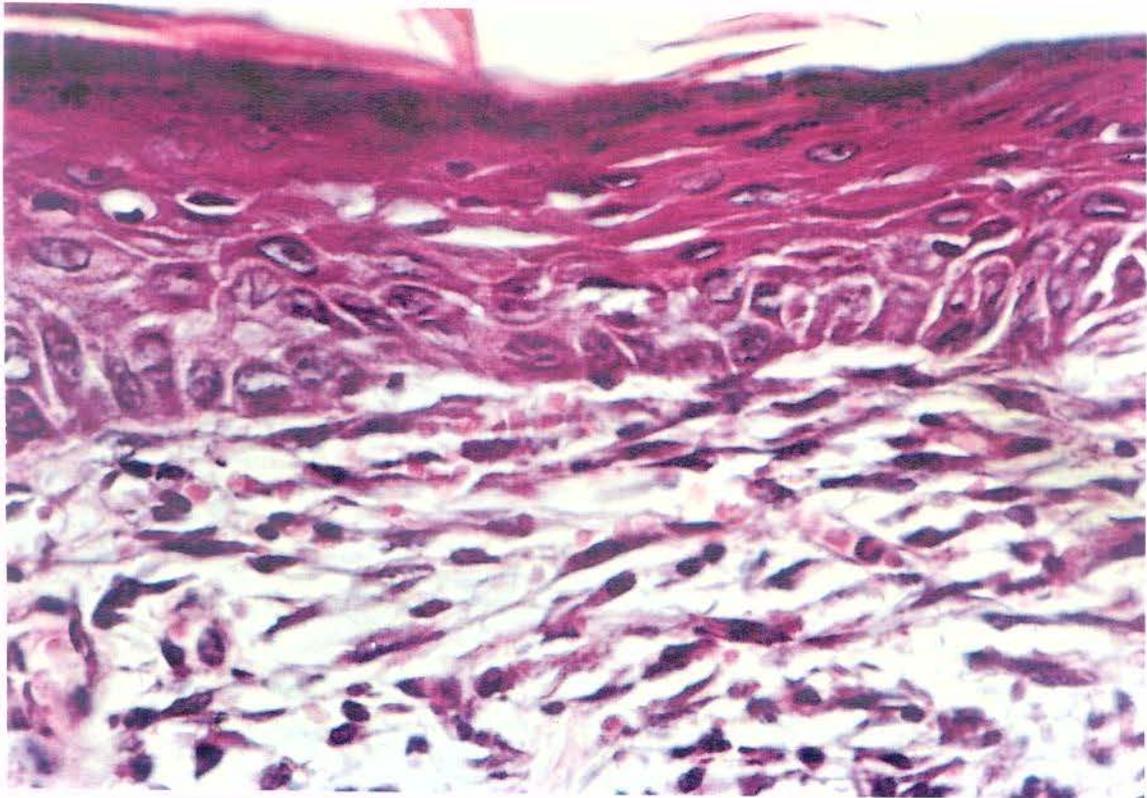


Fig. 27 - G2 120 horas - Porção subjacente ao epitélio escamoso estratificado com proliferação de angioblastos e fibroblastos. O tecido e granulação já iniciando o processo de fibrilogênese com o desaparecimento quase completo da infiltração de leucócitos. A.O: 160X

O epitélio recobre a ferida dos animais do grupo G4, tendo no espaço da incisão tecido de granulação infiltrado de mononucleares (Fig. 28).

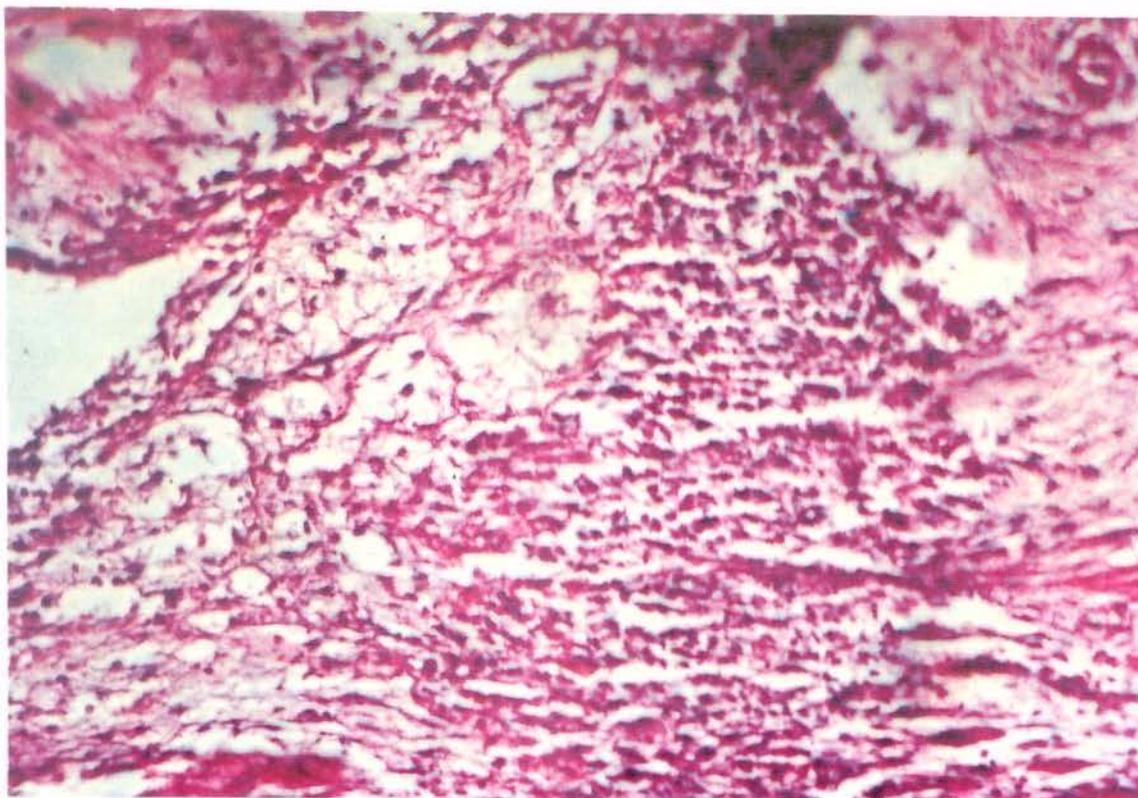


Fig. 28 - G4 120 horas .A.O: 63X

Na base da incisão o processo de reparação mostra os mesmos detalhes observados abaixo de epitélio . (fig . 29).

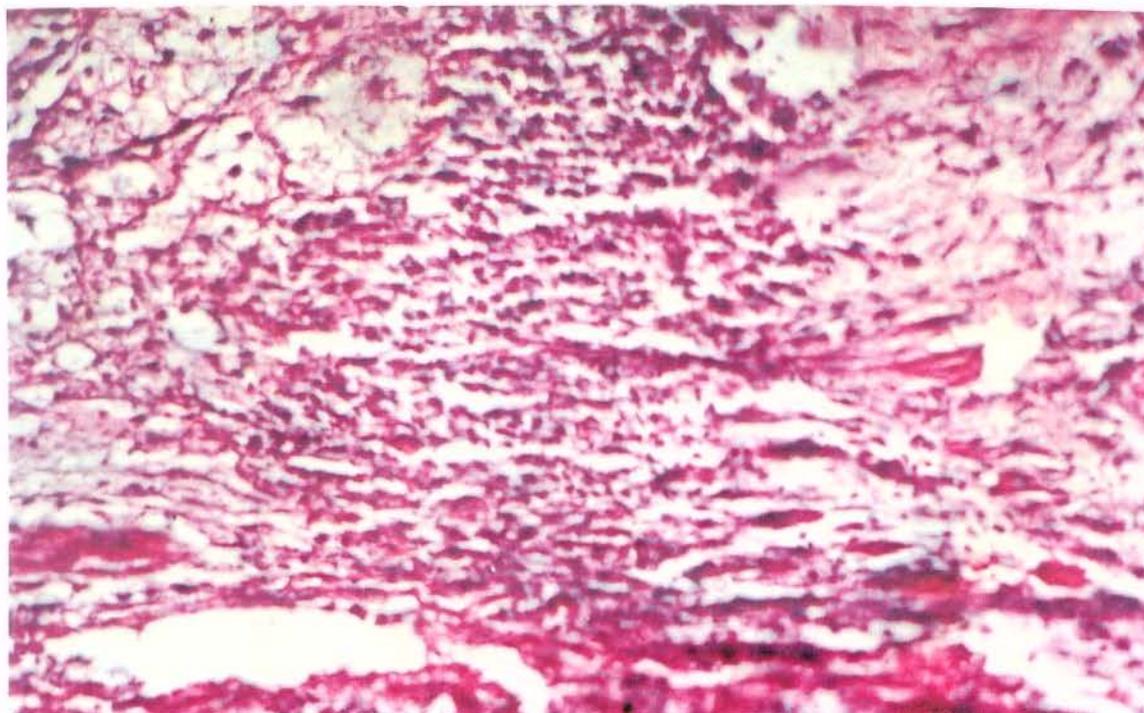


Fig.29 - G4 120 horas .A.O: 63X

168 HORAS:

A este tempo a ferida já se apresenta recoberta pelo epitélio no grupo controle. Abaixo do epitélio, o tecido de granulação mostra uma certa maturação com grande número de fibroblastos. Os leucócitos mononucleares embora em menor número ainda estão presentes . (Fig. 30).

No grupo G2, o epitélio aparece recobrendo o tecido cicatricial, ainda entremeado de macrófagos e linfócitos. A neoformação vascular é proeminente, ainda com a presença de fibroblastos.

No grupo G4, os aspectos microscópicos repetem os detalhes dos grupos GC e G2.

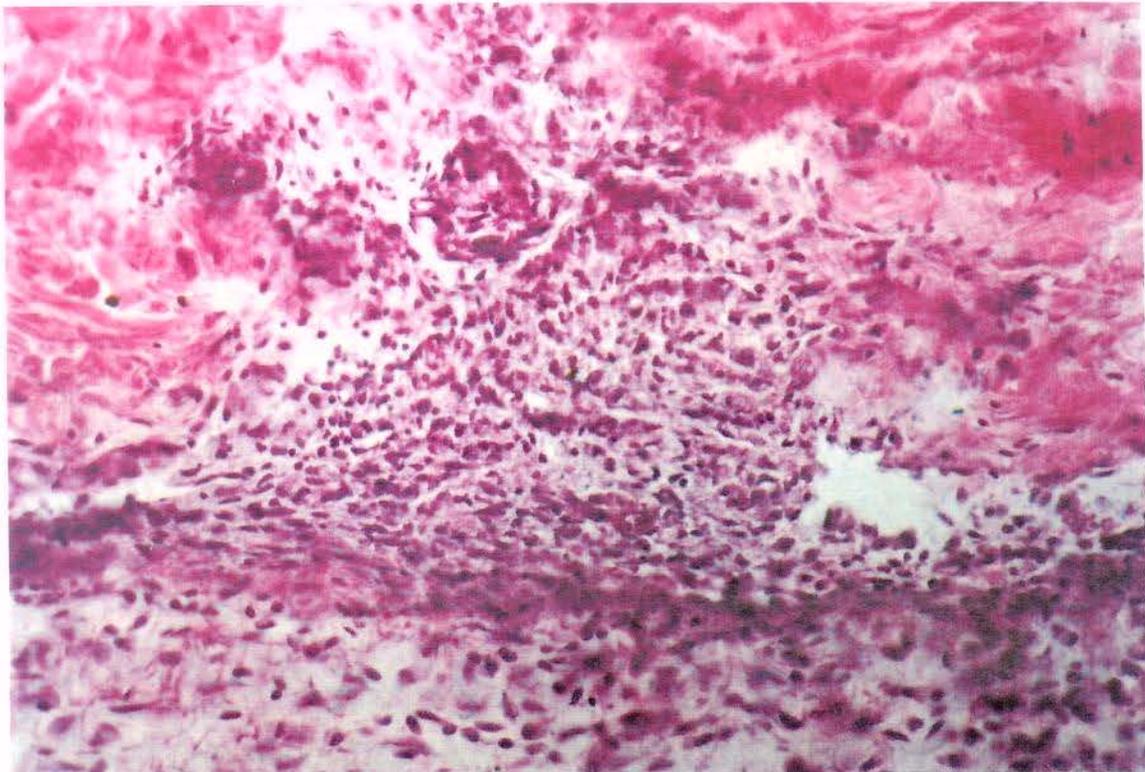


Fig.30 - GC 168 horas - Abaixo do epitélio, tecido de granulação com certo grau de maturação. A.O: 63X

ASPECTOS MACROSCÓPICOS:

Os aspectos macroscópicos foram avaliados segundo as fotografias feitas antes do sacrifício dos animais nos tempos já determinados. Provavelmente tais aspectos variaram de grupo para grupo, sendo que estas variações aconteceram devido a ferida permanecer sem aproximação das bordas; ocorrendo assim um processo de reparo por segunda intenção.

Nos tempos iniciais de zero e uma hora, os aspectos não variaram de grupo para grupo, sendo que as incisões permaneceram abertas com presença de um exsudato pouco espesso recobrimdo o fundo e as margens laterais da incisão. Não houve formação de um coágulo sanguíneo que preenchesse todo o espaço incisional . (fig. 31)



Fig. 31 - Aspecto macroscópico da incisão em pele do dorso de ratos , mostrando os grupos: controle (GC), grupo G2 (2 mg/Kg de peso de diclofenaco sódico e o grupo G4 (4 mg/Kg de peso de diclofenaco sódico).

No tempo de 03 horas em um dos controles apenas as bordas da ferida se coaptaram e nos demais grupos, os aspectos da ferida não se mostram diferentes. (fig. 32).

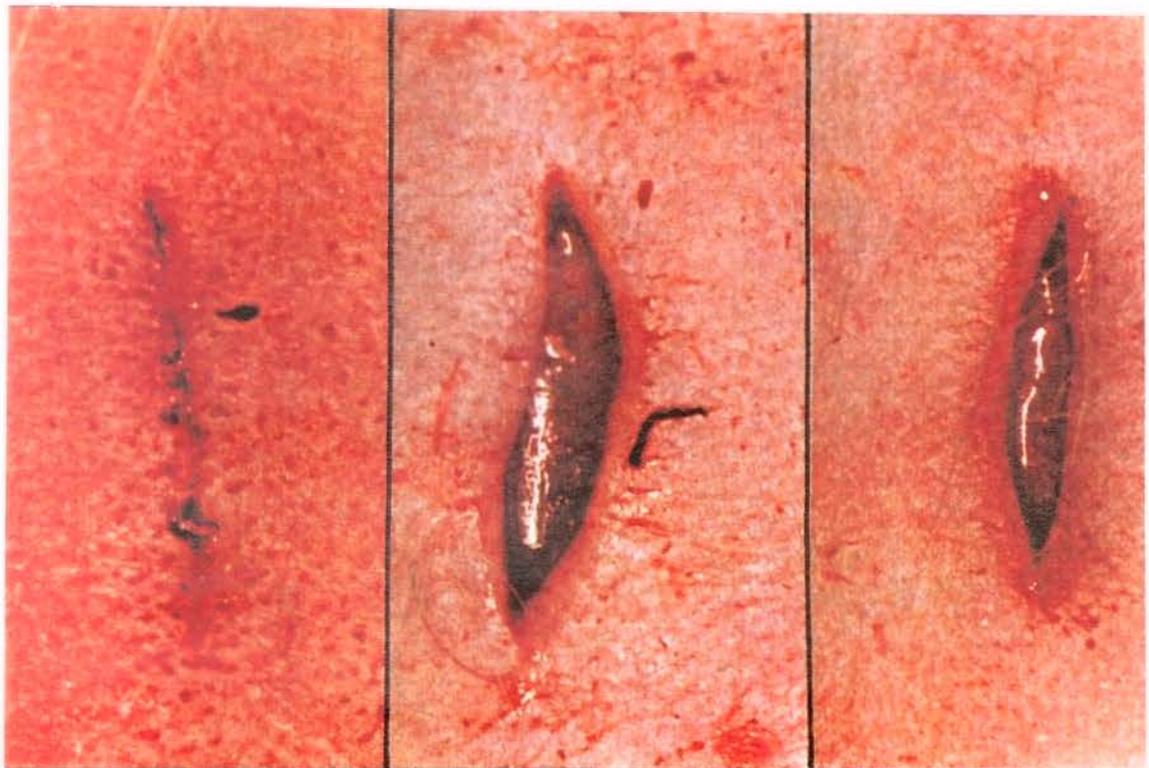


Fig. 32 - Aspectos macroscópicos da pele dos ratos 03 horas após a incisão, nos 03 grupos : GC, G2, G4.

Seis horas após a incisão houve uma alternância na aproximação das bordas da ferida, sendo que um rato de cada grupo teve as bordas da ferida coaptadas. A presença de uma crosta cicatricial se fazia presente; sendo que em um animal do grupo G4 esta crosta era mais volumosa nas extremidades da ferida.(fig. 33)



Fig. 33 - Aspecto macroscópico das incisões após 06 horas, mostrando 02 ratos de cada grupo - GC1 e GC2, G21 e G22, G41 e G42

No tempo de doze horas a crosta cicatricial se estendia por toda lesão, sendo que nos grupos controle seu volume era maior que nos grupos G2 e G4 sucessivamente.(fig. 34).

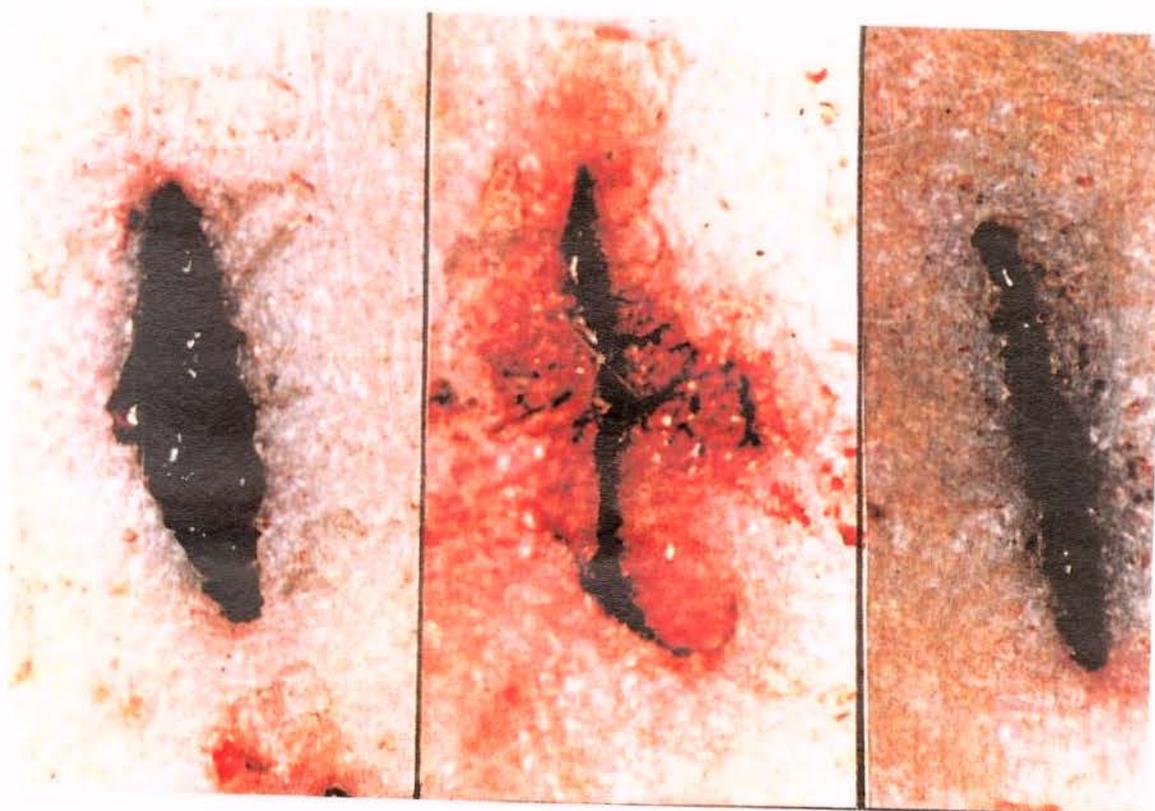


Fig. 34 - Aspecto macroscópico das incisões após 12 horas mostrando: GC - G2 - G4

As 24 horas após a incisão os aspectos dos 03 grupos pareciam ter a crosta cicatricial com um aspecto mais claro .

As margens da ferida nos 03 grupos já se mostram enrugadas, sendo que no animal do grupo G2 havia uma quantidade maior de crosta cicatricial , bem como, as margens se mostravam mais enrugadas. (fig. 35).

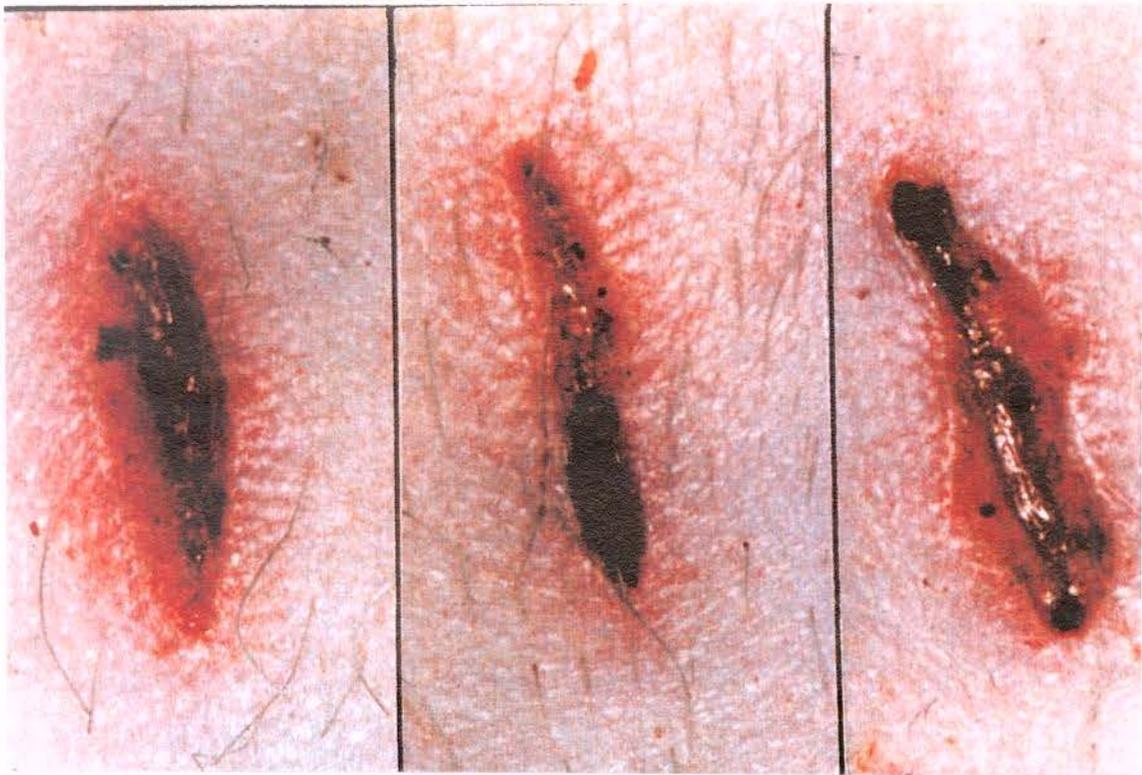


Fig. 35 - Aspectos macroscópicos da incisões após 24 horas, mostrando: GC -G2 - G4.

No grupo controle de 36 horas as feridas já estavam praticamente unidas por uma crosta clara com um aspecto inicial de cicatriz e com suas margens totalmente enrugadas.

No grupo G2 a crosta, ou “casca da ferida”, originária provavelmente da rede de fibrina ressecada superficialmente, se fazia mais presente, enquanto que nos ratos do grupo G4 a ferida se mostrava mais aberta e praticamente sem a crosta cicatricial. (fig. 36).



Fig. 36 - Aspectos macroscópicos mostrando as incisões dos grupos: GC -G2 -G4 após 36 horas.

Quarenta e oito horas após a incisão já se podia observar nos 03 grupos alguma similaridade dos aspectos macroscópicos. A este tempo, a olho nu, não se podia constatar diferenças entre o GC e os experimentais.(fig. 37).

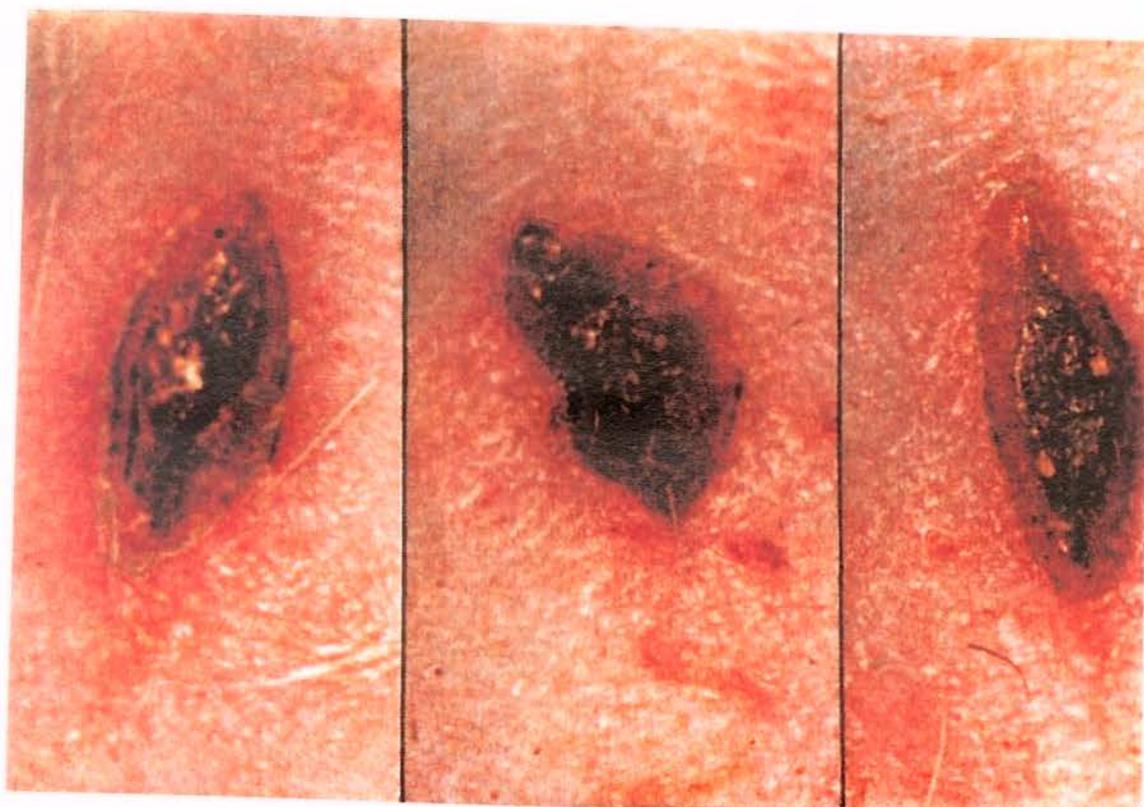


Fig. 37 - Aspectos das incisões ao tempo de 48 horas: GC, G2 e G4

No tempo de 72 horas, aparentemente nos ratos controle a cicatrização se mostra mais avançada, em relação aos outros grupos. Já entre os grupos experimentais, o G4 mostra a incisão mais aberta e com mais exsudato que o G2. (fig.38).



Fig. 38 - Aspecto macroscópico das incisões dos grupos:GC - G2 - G4, após 72 horas.

Obs. As fotografias deste tempo foram feitas após a fixação das peças em formol.

Macroscopicamente após 96 horas, os ratos do que receberam 2mg/Kg de peso de diclofenaco sódico (G2), mostram sua ferida num estágio mais avançado de cicatrização, enquanto que no GC e no G4 os aspectos cicatriciais parecem mais atrasados. (fig.39).



Fig. 39 - Aspecto macroscópico das incisões dos grupos: GC - G2 - G4, após 96 horas.

Cinco dias após a incisão (120 horas) os ratos do GC e um dos ratos do G2 apresentavam uma cicatriz fina quase imperceptível, na área da incisão.

Já os ratos do G4 e um dos ratos do G2 pareciam estar num estágio mais atrasado de cicatrização, com presença ainda da ferida cirúrgica. (fig.40)



Fig. 40 -Mostrando os aspectos macroscópicos dos seis ratos : GC1 - GC2 - G21 - G22 - G41 - G42 , 120 horas após a incisão.

Obs: As fotografias foram feitas após a fixação das peças em formol.

No tempo de 168 horas as diferenças macroscópicas são mínimas entre os grupos GC e G2, entretanto, o G4 ainda mostra sinais da ferida cirúrgica, evidenciando o atraso no processo de reparo. (fig.41).

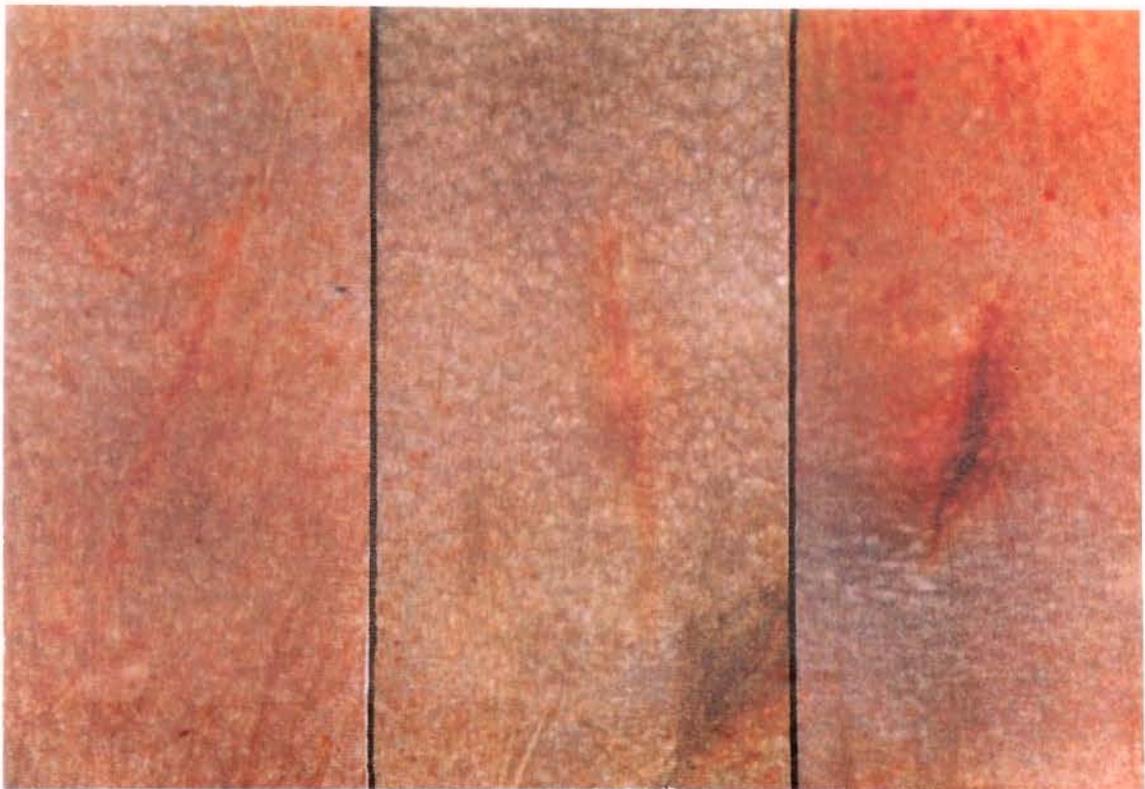


Fig. 41- Aspectos macroscópicos das feridas dos grupos : GC - G2 - G4 , após 168 horas.

5 - DISCUSSÃO

5.1 - DISCUSSÃO DOS RESULTADOS MICROSCÓPICOS:

A droga usada , de comprovada eficiência antiinflamatória, antitérmica e analgésica, tem sido amplamente usada não só no tratamento de diferentes patologias inflamatórias, mas também nas mais variadas intervenções cirúrgicas.

As observações de VANE (1971), de que o diclofenaco sódico , assim como outras drogas antiinflamatórias não esteróides, exercem seus efeitos através da inibição da biossíntese das prostaglandinas, abriram novas perspectivas para um melhor entendimento dos mecanismos de ação dessas drogas, particularmente na dinâmica do processo de cura ou reparação.

Os resultados observados na presente pesquisa mostram que a ação do diclofenaco sódico (VOLTAREN) usado na dosagem de 4mg/Kg de peso , para ratos adultos jovens, de aproximadamente 250 gramas, foi bem evidente a partir de 24 horas , não só em relação ao grupo controle, mas também em relação ao grupo que recebeu 2mg/Kg de peso de diclofenaco sódico.

A observação cuidadosa dos detalhes macroscópicos e microscópicos permitem detectar, claramente variações entre o grupo controle e os experimentais; entretanto, os mecanismos exatos pelos quais estas alterações se estabelecem, são difíceis de serem interpretadas. Os resultados encontrados a nível histológico trazem informações que conjugadas com os conhecimentos já estabelecidos sobre

os mecanismos de ação dessa droga, possibilitam uma discussão nos termos que é colocada a seguir:

O modelo experimental utilizando a incisão em pele de ratos, comparando - se os aspectos morfológicos (macro e microscópico) do grupo controle com os grupos experimentais é simples e pode fornecer informações interessantes.

Após a incisão, de aproximadamente 01 cm de extensão, havia duas opções: suturar as bordas da ferida, coaptando-as e tornando o processo reparacional mais uniforme, porém com ação de um corpo estranho, no caso o fio de sutura; ou deixar a ferida aberta e avaliar a evolução do processo inflamatório e de reparação com o corte aberto, em contato, ao acaso, com possíveis irritantes presentes nas gaiolas dos ratos.

Optou-se pela segunda possibilidade, deixando-se as feridas abertas, expostas ao meio ambiente.

Apesar das possíveis variações induzidas pelas condições ambientais, pode-se observar que nos períodos iniciais (0, 1, 3, 6 e 12 horas), os aspectos morfológicos não mostraram evidências que identificariam, com maior consistência uma possível ação antiinflamatória do diclofenaco sódico.

Surgem então algumas questões que uma segunda pesquisa, melhor orientada, poderia confirmar ou não.

Por exemplo:

- As observações microscópicas de que após 03 horas, os fenômenos inflamatórios são mais intensos no GC que nos grupos experimentais (G2 e G4),

poderiam ser atribuídas a um possível efeito antiinflamatório do diclofenaco sódico neste período?

- A administração da droga 01 hora antes da incisão, permitiria atingir, no rato, um nível plasmático, que após um período de 03 horas pudesse ser implicado como o responsável pela redução dos fenômenos inflamatórios observados nos grupos G2 e G4?

- A infiltração de neutrófilos já nos períodos de 03 horas, muito mais marcantes no GC que nos experimentais, poderia ser interpretado como resultante da menor quimiotaxia leucocitária induzida pela droga, nestes grupos experimentais?

Estes são alguns questionamentos que as variações provocadas pela exposição da ferida ao meio ambiente tornaram um pouco mais difíceis de serem discutidos.

É preciso que se considere também, que neste modelo experimental, existe a participação de outros mediadores químicos da inflamação além das prostaglandinas, como por exemplo, a histamina, a serotonina, a bradicinina e leucotrienos. Particularmente, o rato tem no tecido conjuntivo da pele um grande número de mastócitos, importante reservatório de histamina. A agressão tecidual induzida pela incisão, com certeza, promove o rompimento desses mastócitos e a consequente liberação, na área lesada, da histamina.

Embora o diclofenaco sódico possua um reconhecido efeito antiinflamatório, a sua eficiência terapêutica resulta de uma inibição da biossíntese das prostaglandinas, que são importantes mediadores químicos da resposta inflamatória, mas que atuam numa fase mais tardia da inflamação aguda.

Portanto, particularmente na pele do rato, é preciso que se considere também uma possível ação da histamina no desenvolvimento da inflamação, uma vez que não existe uma ação direta do diclofenaco sódico sobre ela.

Caracteristicamente, a histamina é liberada no momento da lesão celular e exerce seu efeito vasodilatador e de aumento da permeabilidade vascular imediatamente após a liberação.

Provavelmente, as manifestações da resposta inflamatória observadas nestas primeiras horas resulta, em parte da ação da histamina liberada pela agressão tecidual direta. A vasodilatação envolve uma ativação de receptores H1 e H2 nas células endoteliais do leito vascular, escape de proteínas plasmáticas e o recrutamento de leucócitos circulantes .

Portanto, estas pequenas variações dos aspectos morfológicos, observados nas primeiras horas poderiam ser atribuídas, muito mais, a fatores circunstanciais, do que, propriamente à ação do diclofenaco sódico.

Nos grupos de 06 e 12 horas, fica realmente difícil identificar variações que consubstanciem qualquer ação antiinflamatória nas secções examinadas.

É importante que se ressalte, que no desenvolvimento da inflamação, a biossíntese dos produtos do ácido araquidônico envolve duas rotas bem distintas: a cicloxigenase e a lipoxigenase, e que o diclofenaco sódico só atua na primeira via, inibindo a formação de tromboxanas, prostaglandinas, mas não dos leucotrienos.

De fato, conforme ressaltam CAMPBELL & HALUSHKA (1996), estas drogas (AINSD) não inibem o metabolismo do araquidonato pela lipoxigenase, levando a um desvio da cascata do ácido araquidônico e conseqüentemente a uma maior produção de leucotrienos.

Os leucotrienos LTC₄ e LTD₄ parecem atuar nas células endoteliais das vênulas pós-capilares causando exsudação de proteínas plasmáticas de forma muito mais intensa que a histamina (FENERSTEIN, 1984 e PIPER, 1984). Por outro lado, os LTB₄ além de serem potentes agentes quimiotáteis para leucócitos polimorfonucleares, eosinófilos e monócitos, estimulam a agregação dos neutrófilos, promovendo a sua degranulação e os efeitos decorrentes (DAVIES et alli, 1984).

Tantos os aspectos macroscópicos como os microscópicos deste trabalho, mostram uma resposta tecidual mais satisfatória, do ponto de vista clínico, no GC do que no G4, após 24 e 36 horas.

Neste grupo G4, a resposta inflamatória se manifestou um pouco mais exuberante à estes tempos, que no GC e no G2. No G2, os aspectos sempre foram muito mais semelhantes ao GC que do G4, provavelmente, a dose do diclofenaco neste grupo (G2), tenha sido pequena ou até insuficiente para expressar qualquer alteração morfológica detectável, enquanto que o G4, já se tenha tido uma ação mais evidente.

De qualquer forma, as diferenças observadas entre o GC e o G4, permitiriam considerar que a inibição da cicloxigenase pelo diclofenaco poderia ter estimulado, um aumento na ativação da lipoxigenase, com formação significativa de leucotrienos. Estes leucotrienos, (LTC₄, LTD₄, LTB₄), seriam então, os responsáveis, em parte, pelas manifestações da resposta inflamatória observada no G4, a este tempo, o que estaria de acordo com observações já descritos na literatura (DAVIES et all, 1984; PIPER, 1984; FENERSTEIN, 1984).

Após 48 horas todos os 03 grupos mostram ainda os fenômenos exsudativos - vasculares além de pronunciada infiltração de leucócitos, predominantemente, a este tempo de mononucleares (macrófagos e linfócitos).

O G4 apresenta, além dos mononucleares, um infiltrado, aparentemente maior de neutrófilos, sugestivo de um possível retardo na evolução da reação inflamatória, em relação ao GC, provavelmente resultante da ação do diclofenaco sódico.

Neste período também o G2, mostra alguma diferença em relação ao GC, caracterizada por uma resposta inflamatória um pouco mais ativa, intermediária ao GC e o G4.

Com o passar do tempo, as diferenças observadas nos detalhes macro e microscópicos mostram de maneira mais evidente, ação do diclofenaco sódico na evolução do processo de reparo. Já com 72 horas (03 dias) após a incisão (fig. 13, 14, 15, 16 , 17) , pode -se observar nos animais controle , uma menor infiltração leucocitária (fig. 13 e 14) associada ao início da proliferação de angioblastos e fibroblastos (fig 14). O início da formação do tecido de granulação no GC, a este tempo, enquanto que nos grupos G2 e G4 ainda persiste uma intensa infiltração leucocitária, evidencia bem as diferenças na evolução da resposta inflamatória - reparativa.

Na porção mais profunda da incisão e também nas bordas laterais, em todos os animais, fica muito claro, que o processo de reparação é muito mais intenso no GC que nos G2 e G4.

Com 96 horas, todas as observações anteriores se comprovam . As margens do epitélio, na área da incisão, já aparecem unidos, recobrando a superfície, apesar

da presença de tecido desorganizado e ou necrótico, tanto no GC como nos experimentais (fig. 21).

No GC, após 96 horas já se observa uma atividade proliferativa, de angioblastos e fibroblastos, muito mais intensa na base e nas paredes laterais (fig. 18 e 20). Algum material necrótico, infiltrado de mononucleares (macrófagos e linfócitos) ainda pode ser observado (fig. 18 ,19 e 20) .

Nos grupos experimentais , apesar dos fenômenos proliferativos observados mais à distância da agressão, a persistência do exsudato inflamatório, como no G4, e um forte infiltrado de leucócitos (fig. 20) preenchendo grande parte da área incisional, permite que se atribua estes achados a uma possível formação de leucotrienos, cuja atividade na permeabilidade vascular e na quimiotaxia para leucócitos polimorfonucleares, cuja agregação e degranulação provocaria este retardo no processo de reparação da área lesada.

As diferenças observadas nesta área da incisão (fig. 23) e a evidência de fenômenos proliferativos, mais à distância (fig. 24) permitiram associar estes fenômenos a ação do diclofenaco sódico.

Após 05 dias (120 horas), os aspectos são bem consistentes e compatíveis com a evolução dos fenômenos observados desde a agressão até este momento. Isto é, o GC já mostra, a olho nu, na pele, uma continuidade do epitélio, recobrendo a incisão. Microscopicamente, abaixo do epitélio já existe no GC um tecido de granulação em diferentes estágios de maturação conforme se observa a base, o meio ou a superfície da incisão (fig 25 e 26). No G2, o processo de reparação é bem vidente, mostrando aspectos diferentes, como por exemplo, na figura 27, onde o epitélio que recobre a incisão já se apresenta queratinizado e o tecido de

granulação subjacente bem organizado, e áreas onde ainda persiste um infiltrado inflamatório um pouco mais intenso.

No G4, apesar da continuidade do epitélio da superfície, o tecido subjacente, na área da incisão ainda mostra restos de fibrina e marcante infiltração leucocitária (fig. 29 e 30). Os fenômenos proliferativos no fundo da incisão e nas paredes laterais são ainda discretos ou moderados.

Uma semana após, (168 horas) o processo de reparação nos GC e G2 já está bem adiantado. A presença de algum infiltrado leucocitário em meio a proliferação de angioblastos e fibroblastos ainda pode ser observada mesmo no GC.

Apesar das diferenças a nível macroscópico, os detalhes histológicos são praticamente iguais.

5.2 - DISCUSSÃO DOS RESULTADOS MACROSCÓPICOS:

Os resultados mostrados através das fotografias realizadas nos tempos, de 0, 1, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 72, 96, 120, 168 horas dão uma idéia generalizada do avanço do processo de reparo da ferida, tanto no grupo controle(GC), como nos grupos experimentais (G2 e G4).

Nos tempos iniciais de 0, 1, 3 e 6 horas fica difícil estabelecer parâmetros de comparação entre os 03 grupos, pois como mostra a fig. 33, a alternância na aproximação ou não das margens da ferida não possibilitaram ensaiar qualquer discussão sobre tais diferenças nos aspectos macroscópicos.

Apartir de 12 horas o avanço do processo cicatricial foi marcado pelo aspecto geral e pela presença de uma crosta, que se fez mais evidente no G4 (fig. 34).

Vinte e quatro horas após a incisão os aspectos sugeriam uma resposta inflamatória evidenciada pelo edema e pela separação das margens da ferida, que no GC parecia ser mais discreta, particularmente em relação ao G4.

Os aspectos tornam -se mais acentuados ainda por volta de 36 horas (fig. 35), quando no GC praticamente a ferida está unida ; enquanto que no G4 ainda permanece aberta, edemaciada e com algum grau de exsudato.

Nos ratos usados para as observações no período de 48 horas, algumas variações requerem uma análise mais cuidadosa. Dos ratos do GC, um deles apresentou um quadro inflamatório menos intenso que os ratos do G2 e G4, enquanto que um dos ratos do G4 mostrou uma maior reação inflamatória quando comparado com os ratos dos demais grupos, o que confirmaria os aspectos analisados até aqui.

As 72 e 96 horas, o GC se mostrou num estágio cicatricial mais avançado que o G2 que por sua vez tinha marcadamente uma cicatrização melhor que o G4 principalmente do tempo de 96 horas.

Analizando os tempos finais de 120 e 168 horas percebemos que dos seis ratos do tempo de 120 horas, os dois controles e um do animais do G2 tem sua ferida fechada com uma delgada cicatriz, enquanto que os demais permanecem com as feridas abertas, sendo que os ratos do G4 estão num estágio mais atrasado de reparação; e no tempo de 168 horas fica clara a diferença da cicatrização das feridas principalmente ao se comparar o GC ao G4 .

As observações macroscópicas permitem interpretar que as diferenças marcantes entre o GC e o G4, resultam efetivamente da ação do diclofenaco sódico na dosagem de 4mg/Kg de peso de diclofenaco sódico. Os mecanismos pelos quais essas modificações ocorrem já foram discutidas através dos resultados histológicos.

As variações dessas manifestações macroscópicas entre o GC eo G2, que foram menos pronunciadas, poderiam resultar, ou, de uma dose baixa em relação ao metabolismo do rato, e que não teria tido efeito algum, ou então, que os possíveis efeitos (analgésicos, antipiréticos, antiinflamatórios), tenham se manifestado sem alterar o processo inflamatório no que diz respeito a reparação da ferida, caracterizando uma dosagem ideal e adequada.

6 - CONCLUSÕES

1 - A reparação de uma incisão feita em pele dos ratos que receberam 4mg/Kg de peso de diclofenaco sódico (VOLTAREN) apresentou um retardo em comparação ao grupo controle.

2 - A resposta inflamatória inicial (0, 1, 03, 06 e 12 horas) após a incisão apresentou pequenas variações morfológicas, que não puderam ser atribuídas só ao diclofenaco sódico.

3 - A partir de 24 horas, os grupos de ratos que receberam 4 mg/Kg de peso de diclofenaco sódico mostraram sempre uma inflamação mais intensa e ativa quando comparados ao GC e ao G2

4 - Após 4 e 5 dias, as diferenças entre o GC e os grupos experimentais mostram de maneira clara, os efeitos do diclofenaco na evolução da inflamação e do processo de cura, caracterizado pela presença de restos necróticos e de infiltrado inflamatório na área lesada dos animais que receberam a droga.

7 . SUMMARY

A ação de uma droga antiinflamatória não-esteróide (diclofenaco sódico) foi avaliada, em diferentes períodos de tempo, após uma incisão cirúrgica na pele de ratos machos, adultos jovens, pesando mais ou menos 250 gramas cada.

Os grupos experimentais receberam, 1 hora antes da incisão cirúrgica, uma injeção intraperitoneal de diclofenaco sódico (Voltaren). Um grupo recebeu 2 mg/Kg de peso da droga (G2); o outro recebeu 4 mg/Kg de peso da droga (G4). O grupo controle (GC) recebeu 2 mg/Kg de peso de PBS, também por injeção intraperitoneal.

Uma hora após estas administrações, foi feita uma incisão cirúrgica de aproximadamente 1 cm de extensão, na pele do dorso dos 72 ratos. Cada grupo de 6 ratos (2 do GC, 2 do G2 e 2 do G4) era sacrificado após um determinado período de tempo (0, 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120 e 168 horas após a incisão).

Os efeitos da droga na evolução do processo inflamatório e da reparação foram avaliados através dos aspectos morfológicos (macro e microscópicos).

As observações macroscópicas e a nível de microscopia óptica mostraram que o diclofenaco sódico modifica as respostas teciduais, provocando um retardo na evolução do processo inflamatório e na cura da lesão.

Estas alterações são mais evidentes a partir das 72 horas, e de maneira mais marcante no grupo G4 que nos demais.

O bloqueio da biossíntese de prostaglandinas pelo diclofenaco sódico modificou a expressão macro e microscópica da lesão nos diferentes períodos de tempo, possivelmente pela intensificação na formação de leucotrienos.

Apesar da ação antiinflamatória do Voltaren, outros mediadores químicos da inflamação além das prostaglandinas, mantiveram a evolução do processo. As possíveis interações das diferentes substâncias liberadas na área lesada, do momento zero até 168 horas, determinaram as alterações observadas nesta pesquisa.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. CAMPBELL, W.B., HALUSHKA, P.V. Lipid-derived autacoids: eicosanoids and platelet-activating factor. In: HARDMAN, J.G. et al., eds. *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. 9.ed. New York: McGraw-Hill, 1996. chapt. 26, p.601-616.
2. DAVIES, P. The role of arachidonic acid oxygenation products in pain and inflammation. *A. Rev. Immun.*, v.2 , p.335-357, 1984.
3. FENERSTEIN, G. Leukotrienes and cardiovascular system. *Prostaglandins*, Los Altos, v.27, p.781-802, 1984.
4. KRAL, J.G. Analgesic effects of prostaglandin synthesis inhibition by diclofenac sodium . *Semin. Artrits Reum.*, Orlando, v.15, n.2, p.93-96, Nov. 1985. [supplement, 1]
5. KU, E.C. Diclofenac sodium (GP 45840, VOLTAREN), a potent inhibitor of prostaglandin synthetase. *Biochem. Pharmac.*, Elmsford, v.24 , p.641-643, Agosto 1975.
6. KU, E.C. The effects of diclofenac sodium on arachidonic acid metabolism. *Semin. Artrits Rheum.*, Orlando, v.15, n.2, p.36-41, Nov. 1985. [supplement, 1]

7. LEPOW, I.H., WARD, P.A. *Inflammation: mechanism and control*. New York, Academic Press, 1972 , p.13-36.
8. LETHOLA, J., SIPPONEN, P. A gastroscopic and histological double - blind study of the effects of diclofenac sodium and naproxen on the human gastric mucosa. *Scand. J. Rheum.*, Stockholm, v.6, p.97-102, 1977.
9. MENASSÉ, R. Pharmacological properties of diclofenac sodium and its metabolites. *Scand. J. Rheum.*, Stockholm, v.2, p.5-16, 1978. [supplement, 22]
10. PIPER, P.J. Formation and actions of leukotrienes. *Physiol. Rev.*, Bethesda, v.64, p.744-761, 1984.
11. RIESS, W. Pharmacokinetics and metabolism of the anti-inflammatory agent Voltaren. *Scand. J. Rheum.*, Stockholm, p.17-29, 1978. [supplement, 22]
13. ROBBINS, S.L. *Patologia estrutural e funcional*. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1989.
14. ROTH, S.H. Special studies of diclofenac and safety: gastrointestinal, renal, hepatic and other consequences of therapy. *Semin. Arthritis Rheum.*, Orlando, v.15, n.2, p.99-104, Nov. 1985. [supplement, 1]

15. RYAN, G., MAJNO, G. Acute inflammation. *Am. J. Path.*, Philadelphia, v.10, , p.86-185, 1977.

16. SALLMANN, A.R. The history of diclofenac. *Semin. Artrits Rheum.*, Orlando, v.15, n.2, p.57-60, Nov. 1985. [supplement, 1]

17. SHOLER, D.W. Pharmacology of diclofenac sodium (Voltaren). *Semin. Artrits Rheum.*, Orlando, v.15, n.2, p.61-64, Nov. 1985. [supplement, 1]

18. TRUMMEL, C.L. Drogas antiinflamatórias. In: NEIDLE, E.A., YAGIELA, J.A. *Farmacologia e terapêutica para cirurgiões dentistas*. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. cap. 22 , p.251.

19. VANE, J.R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin - like drugs. *Nature - N. Biol.* p.231-235,1971

20. WILHEIM, D.L., MASON, B. Vascular permeability changes in inflammation: the role of endogenous permeability factors in mild thermal injury. *Br. J. exp. Path.*, Oxford, v.41 , p.487-506, 1960.

21. ZWEIFACH, B.W., GRANT, L., MCCIVSKEY, R.T. The inflammatory process. New York: Academic Press, 1965. v.1, chapt. 4, p.161-196.